

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年8月18日 (18.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/075641 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09,
C12Q 1/02, C07K 14/435, 14/705, A61K 38/00, A61P
1/00, 3/04, G01N 33/15

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/001887

(22) 国際出願日: 2005年2月9日 (09.02.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-031591 2004年2月9日 (09.02.2004) JP
特願 2004-368509
2004年12月20日 (20.12.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザ
イ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東
京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 飛弾 隆之 (HIDA,
Takayuki) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光台
5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波研究所内
Ibaraki (JP). 広橋 智子 (HIROHASHI, Tomoko) [JP/JP];
〒3002635 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3
エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 澤井 徹
(SAWAI, Toru) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東
光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波研究所
内 Ibaraki (JP). 生木 尚志 (SEIKI, Takashi) [JP/JP]; 〒
3002635 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エー
ザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 高橋 英機
(TAKAHASHI, Eiki) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば
市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波研
究所内 Ibaraki (JP). 小笹 美智子 (KOSASA, Michiko)
[JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光台5丁目1番

地3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 原田
耕吉 (HARADA, Kokiichi) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つ
くば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波
研究所内 Ibaraki (JP). 新井 徹 (ARAI, Toru) [JP/JP]; 〒
3002635 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エー
ザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
3000847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル
6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SCREENING METHOD

(54) 発明の名称: スクリーニング方法

(57) Abstract: By intracerebroventricularly administering relaxin-3 binding to SALPR to rats and observing feed intake, body weight, fat amount, etc. of the animals after the administration, it is found out that relaxin-3 has useful effects of promoting food intake, promoting body weight gain and causing obesity. Thus, it is possible to provide a polypeptide having useful effects of promoting food intake, promoting body weight gain and causing obesity; a remedy for diseases containing this polypeptide; a method of screening a compound, a substance or a salt thereof activating or inhibiting a receptor of the polypeptide; a screening kit therefor; and a food intake regulating agent, a remedy for obesity, a remedy for diabetes and so on containing a substance inhibiting the expression of the polypeptide, etc.

(57) 要約: 本発明者らは、SALPRと結合するリラキシン-3をラット脳室内に投与し、投与後の摂食量、体重、脂肪量などを観察することにより、リラキシン-3が有用な摂食亢進作用、体重増加作用および肥満作用を有することを見出した。本発明により、有用な摂食亢進作用、体重増加作用および肥満作用を有するポリペプチド、該ポリペプチドを含有する疾患治療剤、該ポリペプチドの受容体の賦活化、抑制化をする化合物、物質もしくはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、および該ポリペプチドの発現を阻害する物質などを含有してなる摂食抑制剤、肥満治療剤、糖尿病治療剤などが提供される。

明 細 書

スクリーニング方法

技術分野

- [0001] 本発明は、有用な摂食亢進作用、体重増加作用および肥満作用を有するポリペプチド、該ポリペプチドを含有する疾患治療剤、該ポリペプチドの受容体の賦活化、抑制化をする化合物、物質もしくはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、および該ポリペプチドの発現を阻害する物質などを含有してなる摂食抑制剤、肥満治療剤または糖尿病治療剤などに関する。

背景技術

- [0002] 摂食は動物が生きていくために欠かせない行動である。肥満は飽食時代の現代社会にあつて、摂食量とエネルギー消費の調節・バランスが崩れた結果として生じたものであると考えられている。肥満は生活習慣病を始めとする各種疾病の危険因子でもあるため、社会的な関心が高まってきている。食事療法や運動療法など、摂食量とエネルギー消費のバランスを改善する基本的な治療法はあるものの、現状では肥満患者・その予備群は増加している。最近では末梢組織での栄養吸収を抑制する薬剤や中枢性に作用し摂食量を減少させる薬剤も開発されているが、肥満治療剤として摂食量を抑制する有効かつ安全な薬剤の開発は望まれている。
- [0003] 摂食行動は脳中枢神経からの指令と、末梢組織からのフィードバックによって中枢神経がさらに指令を送る循環で制御されていることがわかりつつあり、その主体である脳での摂食制御機構に焦点を当てた研究が盛んに行なわれている。脳の特定領域を破壊した動物の研究や、神経ペプチドや神経伝達物質を用いた機能解析により、視床下部領域が摂食行動に重要な役割を果たしていることが分かってきている。また、視床下部には多くの神経伝達物質や神経ペプチドおよびそれらに対する受容体（レセプター）が発現しており、これらと摂食行動との関連が示されている。例えば摂食の亢進には視床下部弓状核に存在するニューロペプチドYやアグーチ関連ペプチド等が関わること、さらに摂食の抑制には同所に存在するメラノコルチンや視床下部室傍核から放出されるコルチコトロピン放出ホルモンやサイトロピン放出ホルモン

が関わっていることが報告されている(非特許文献1)。しかしながら、摂食を制御する複雑な神経ネットワークには未だ不明な部分が多く、未だなお新規な神経伝達因子やその局在についての新たな知見が得られつつある状況である。

[0004] 摂食行動の制御に関わる神経伝達物質や神経ペプチドなどの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプターを介して機能を発揮する。これらのレセプターの中で細胞膜を7回貫通する構造を有し、細胞内で3量体Gタンパク質と共役するレセプターは特にGタンパク質共役型受容体(GPCR)と分類されている。GPCRは特異的なリガンドが結合した時に細胞内にシグナルを伝達し、細胞の賦活化や抑制化をすることで、各種臓器・器官での機能発現に重要な役割を担っている。それ故にGPCRを賦活化するアゴニストや抑制するアンタゴニストと呼ばれる物質は、医薬品として使用されている。GPCRに分類されるレセプターの中でもその特異的なリガンドが未同定のものが数多く知られており、それらはオーファンGPCRと呼ばれている。オーファンGPCRは新たな治療薬のターゲットとしての可能性を秘めており、生体内のリガンド同定や機能を賦活もしくは抑制する物質の研究が進められている。このようにして同定されたリガンドや物質を生体に投与してレセプターとそのリガンドの機能を解明することは、医薬品の開発を提供する上できわめて重要である。

[0005] 近年の遺伝子配列情報の充実により、既知のタンパク質・ペプチドの配列を元にその相同性や法則性を導きだし、未知のペプチドやタンパク質を予測して、GPCRの新たなリガンドとして同定する方法も可能となった。インスリン・リラキシン(Insulin・Relaxin)ファミリーに属するリラキシンは、黄体や胎盤から産生される分泌ペプチドであり、妊娠の維持と出産に関わる作用をもつことが以前から知られていた。それ以外の作用としては、例えばリラキシン-2のラット静脈内投与による摂水量の亢進という報告はなされているが(非特許文献2)、リラキシンの摂食行動との関連については知られていない。リラキシンをコードするDNAの塩基配列を元に遺伝子配列データベースから新たに同定されたDNAのコードするタンパク質が、リラキシン-3(Relaxin-3)/INSL7と名づけられたポリペプチドである(特許文献1)。見出されたリラキシン-3は、免疫細胞系であるTHP-1の細胞内サイクリックAMP(cAMP)の上昇をともなうて細胞を賦活化することが報告された(特許文献2、非特許文献3)。その後リラキシ

ン-3は、リラキシナー2と共に、GPCRであるLGR7に結合するリガンドの一つであることが示された(非特許文献4)。LGR7は脳と末梢組織に発現しており、これまでに生殖器官の発達や妊娠・出産に関わることが示唆されているが、摂食との関連については良く分かっていない。

[0006] 最近、生体内のリガンドが未同定のGPCRであった、SALPR(GPCR135)と名づけられているレセプターや、GPR100(hGPCR11、GPCR142)と呼ばれるレセプターのリガンドがリラキシナー3であることが報告された(非特許文献5、6、特許文献3)。また、特許文献4-7にもこれらのレセプターに関連する記載がある。SALPRは脳に局在することが知られており(非特許文献7)、特に視床下部の室傍核と視索上核に存在することが報告された(特許文献3、非特許文献6)。一方、GPR100は全身性に発現しているレセプターであることが報告されている(非特許文献8、9)が、その機能については不明なままである。

一方、リラキシナー3は脳内の橋と呼ばれる領域に存在することが報告されており(非特許文献6)、リラキシナー3が脳内ペプチドとして中枢性に何らかの機能を発揮している可能性は考えられていたが、これまでにリラキシナー3が摂食を調節するか否かについても、リラキシナー3が体重調節に関与するか否かについても報告されていなかった。また、リラキシナー3が肥満に関連するかについても知られていなかった。

[0007] 特許文献1:国際公開第01/068862号パンフレット

特許文献2:特開2002-345468号明細書

特許文献3:国際公開第2004/082598号パンフレット

特許文献4:国際公開第00/24891号パンフレット

特許文献5:国際公開第01/48189号パンフレット

特許文献6:国際公開第02/31111号パンフレット

特許文献7:国際公開第02/61087号パンフレット

非特許文献1:Spiegelmanら、Cell, 104, p. 541-543, 2001

非特許文献2:Sinnayahら、Endocrinology, 140, p. 5082-5086, 1999

非特許文献3:Bathgateら、J. Biol. Chem., 277, p. 1148-1157, 200

非特許文献4:Sudoら、J. Biol. Chem. , 278, p. 7855-7862, 2003

非特許文献5:Takedaら、FEBS Letter, 520, p. 97-101, 2002

非特許文献6:Liuら、J. Biol. Chem. , 278, p. 50754-50764, 2003

非特許文献7:Matsumotoら、Gene, 248, p. 183-189, 2000

非特許文献8:Liuら、J. Biol. Chem. , 278, p. 50765-50770, 2003

非特許文献9:Boelsら、Br. J. Pharmacol. , 140, p. 932-938, 2003

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、有用な摂食亢進作用、体重増加作用および肥満作用を有するポリペプチド、該ポリペプチドを含有する疾患治療剤、該ポリペプチドの受容体の賦活化、抑制化をする化合物、物質もしくはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、および該ポリペプチドの発現を阻害する物質などを含有してなる摂食抑制剤、肥満治療剤または糖尿病治療剤などに関する。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、リラキシン-3をラット脳室内に投与し、投与後の摂食量を観察することにより、リラキシン-3が摂食亢進作用を有することを見出した。また、ラットにリラキシン-3を単回投与した後に、当該ラットから採取した血液を測定した結果、体脂肪増加の指標として知られるレプチン濃度が血液中で上昇していることを見出した。さらに、ラット脳室内へリラキシン-3の持続投与を行なったところ、リラキシン-3投与群では対照のvehicle投与群に比べて有意な摂食量の増加と体重増加作用が認められた。リラキシン-3の持続投与によって両群において運動量に差はなかった。これらのことから、リラキシン-3は摂食亢進作用と共に体重増加作用も有することが初めて明らかとなった。さらに、リラキシン-3を投与し体重が増加したラットにおいては脂肪量の増加および、体脂肪含量と相關する血中レプチン濃度が上昇していた。また、糖尿病と関連するインスリン濃度も上昇していた。以上より、リラキシン-3は摂食亢進作用、体重増加作用、肥満作用を有するポリペプチドであると考えられる。本発明はこれらの知見に基づいて達成されたものである。

[0010] すなわち、本発明は、

(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる摂食亢進剤。

(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる体重増加剤。

(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる脂肪量増加剤。

(4) 次の工程;被験物質を、

(A) リラキシン-3受容体、リラキシン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、

(B) リラキシン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする摂食を亢進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(5) 次の工程;

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A) リラキシン-3受容体、リラキシン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、

を含むことを特徴とする摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(6) 次の工程;

(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする前記(5)に記載の摂食を亢進または抑制する化合物または
その塩のスクリーニング方法。

(7)リラキシニン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴と
する前記(4)〜(6)のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

(8)SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを
特徴とする前記(7)に記載のスクリーニング方法。

(9)次の工程;被験物質を、

(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面
分に接触させる工程、

(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする摂食を亢進する化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(10)次の工程;

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポ
リペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配
列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはそ
の塩、および被験物質を、

(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面
分に接触させる工程、

を含むことを特徴とする摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニ
ングキット。

(11)次の工程;

(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする前記(10)に記載の摂食を亢進または抑制する化合物または
その塩のスクリーニングキット。

(12)リラキシニン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴
とする前記(9)〜(11)のいずれか一項に記載のスクリーニングキット。

(13)SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを

特徴とする前記(12)に記載のスクリーニングキット。

(14)配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる体重増加を必要とする疾患の治療剤。

(15)疾患が拒食症または悪疫質である前記(14)に記載の治療剤。

(16)次の工程;被験物質を、

(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、

(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする体重増加作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(17)次の工程;

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、

を含むことを特徴とする体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(18)次の工程;

(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする前記(17)に記載の体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(19)リラキシニン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする前記(16)〜(18)のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

(20)SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを

特徴とする前記(19)に記載のスクリーニング方法。

(21) 次の工程;被験物質を、

(A) リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

(B) リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする体重増加作用を有する化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(22) 次の工程;

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A) リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

を含むことを特徴とする体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(23) 次の工程;

(B) リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする前記(22)に記載の体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(24) リラキシニン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする前記(21)〜(23)のいずれか一項に記載のスクリーニングキット。

(25) SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする前記(24)に記載のスクリーニングキット。

(26) 次の工程;被験物質を、

(A) リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

(B) リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(27) 次の工程；

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A) リラキシン-3受容体、リラキシン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、

を含むことを特徴とする肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(28) 次の工程；

(B) リラキシン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする前記(27)に記載の肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(29) リラキシン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする前記(26)～(28)のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

(30) SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする前記(29)に記載のスクリーニング方法。

(31) 次の工程；被験物質を、

(A) リラキシン-3受容体、リラキシン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、

(B) リラキシン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(32) 次の工程；

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A) リラキシン-3受容体、リラキシン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面

分に接触させる工程、

を含むことを特徴とする肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(33) 次の工程;

(B) リラキシン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする前記(32)に記載の肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(34) リラキシン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする前記(31)〜(33)のいずれか一項に記載のスクリーニングキット。

(35) SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする前記(34)に記載のスクリーニングキット。

(36) SALPR阻害作用を有する化合物を含有する摂食抑制剤。

(37) SALPR阻害作用を有する化合物が、前記(7)または(8)に記載のスクリーニング方法により得られる化合物であることを特徴とする前記(36)に記載の剤。

(38) SALPR阻害作用を有する化合物を含有する体重減少剤。

(39) SALPR阻害作用を有する化合物が、前記(19)または(20)に記載のスクリーニング方法により得られる化合物であることを特徴とする前記(38)に記載の剤。

(40) SALPR阻害作用を有する化合物を含有する脂肪量減少剤。

(41) SALPR阻害作用を有する化合物が、前記(29)または(30)に記載のスクリーニング方法により得られる化合物であることを特徴とする前記(40)に記載の剤。

(42) SALPR阻害作用を有する化合物を含有する肥満治療剤。

(43) SALPR阻害作用を有する化合物が、前記(19)、(20)、(29)または(30)のいずれか一項に記載のスクリーニング方法により得られる化合物であることを特徴とする前記(42)に記載の剤。

(44) SALPR阻害作用を有する化合物を含有する糖尿病治療剤。

(45) SALPR阻害作用を有する化合物が、前記(19)、(20)、(29)または(30)のいずれか一項に記載のスクリーニング方法により得られる化合物であることを特徴とする前記(44)に記載の剤。

(46) SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを

特徴とする前記(36)～(45)のいずれか一項に記載の剤。

(47)リラキシン-3受容体に作用する化合物をヒトまたはヒト以外の生物に投与し、投与後の摂食量を測定する工程を含むことを特徴とする、摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(48)リラキシン-3受容体に作用する化合物が、前記(4)～(8)のいずれか一項に記載の方法により得られる化合物である、前記(47)に記載の方法。

(49)リラキシン-3受容体に作用する化合物をヒトまたはヒト以外の生物に投与し、投与後の体重を測定する工程を含むことを特徴とする、体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(50)リラキシン-3受容体に作用する化合物が、前記(16)～(20)のいずれか一項に記載の方法により得られる化合物である、前記(49)に記載の方法。

(51)リラキシン-3受容体に作用する化合物をヒトまたはヒト以外の生物に投与し、投与後の肥満の指標を測定する工程を含むことを特徴とする、肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(52)リラキシン-3受容体に作用する化合物が、前記(26)～(30)のいずれか一項に記載の方法により得られる化合物である、前記(51)に記載の方法。

などに関する。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]pBabeCL(SALPR)IHの構築図を示す。

[図2A]CRE4VIP/pBluescriptISK(+)の構築図を示す。

[図2B]pBabeCLXの構築図を示す。

[図2C]pBabeCLcre4vPdNNの構築図を示す。

[図3]SALPRを発現させたSE302細胞におけるフォルスコリン添加によって上昇した転写活性のリラキシン-3による特異的な用量依存的抑制を示す。黒四角はリラキシン-3を添加した場合を示す。白四角はインスリンを添加した場合を示す。横軸の数字は添加した各リガンドの最終濃度(nmol/L)を示す。縦軸はフォルスコリン1 μ mol/Lを添加した細胞上清のアルカリフォスファターゼの活性を100、フォルスコリンを添加していない細胞上清の活性を0として算出した各活性の割合を示す。各点

は平均値(N=3)と標準偏差を示す。

[図4]SALPR-SE302細胞を用いたリラキシノー3拮抗化合物の評価(スクリーニング)を示す図である。Aは、SALPR-SE302細胞を使用し、Bは、SE302細胞を使用した。図中、FK(-)はフォルスコリン無処置群、FK(+)は3 μ Mフォルスコリン処置群、FK(+)&RLX-3はフォルスコリンと3nM リラキシノー3の処置群、FK(+)&RLX-3&化合物1はフォルスコリンとリラキシノー3と化合物1を共存させた処置群を示す。

[図5]正常ラット脳室内へのリラキシノー3の単回投与による摂餌量への作用を示す。白四角はvehicle投与群(対照)を、黒四角はリラキシノー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの摂餌量(g)の平均値と標準誤差を示す。

[図6]正常ラット脳室内へのリラキシノー3の単回投与による血中レプチン濃度への作用を示す。白四角はvehicle投与群(対照)を、黒四角はリラキシノー3投与群を示す。縦軸は各群の血中のレプチン濃度(ng/mL)の平均値と標準偏差を示す。

[図7]正常ラットの脳室内に持続投与したリラキシノー3による体重増加量への作用を示す。白四角はvehicle投与群(対照)を、黒四角はリラキシノー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの体重増加量(g)の平均値と標準偏差を示す。

[図8]正常ラットの脳室内に持続投与したリラキシノー3による摂餌量への作用を示す。白四角はvehicle投与群(対照)を、黒四角はリラキシノー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの摂餌量(g)の平均値と標準偏差を示す。

[図9]正常ラットの脳室内に持続投与したリラキシノー3による精巣周囲脂肪重量への作用を示す。白四角はvehicle投与群(対照)を、黒四角はリラキシノー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの脂肪重量(g)の平均値と標準偏差を示す。

[図10]正常ラットの脳室内に持続投与したリラキシノー3による血中ホルモンの変動を示す。図10Aは血中レプチン濃度への作用を示す。白四角はvehicle投与群(対照)を、黒四角はリラキシノー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの血中レプチン濃度(ng/ml)の平均値と標準偏差を示す。図10Bは血中インスリン濃度への作用を示す。白四角はvehicle投与群を、黒四角はリラキシノー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの血中インスリン濃度(ng/ml)の平均値と標準偏差を示す。

[図11]脳室内にリラキシナー3を持続投与した後、自発運動量を測定しながら飼育したラットの体重増加量の変化を示す。白四角はvehicle投与群(対照)を、黒四角はリラキシナー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹当たりの体重増加量(g)の平均値と標準偏差を示す。図中の白三角は、明期の運動量測定日、黒三角は暗期の運動量測定日を示す。

[図12]脳室内にリラキシナー3を持続投与したラットの自発運動量に対する作用を示す。白四角はvehicle投与群(対照)を、黒四角はリラキシナー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの全活動量(カウント)の平均値と標準偏差を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0012] リラキシナー3(relaxin-3)

本発明で使用する「リラキシナー3」とは、遺伝子配列のデータベースから新たに同定されたリラキシナー3(Relaxin-3) (INSL7 (GenBankアクセッション番号NM_080864)とも称されている。)と称せられているポリペプチドであり(J. Biol. Chem. 277, 1148-1157(2002))、(i)配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。また、リラキシナー3には、(ii)配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと機能的に等価な改変ポリペプチド、(iii)配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる相同ポリペプチドが含まれる。本発明に使用するリラキシナー3としては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」が好ましい。なお、前記ポリペプチドには、ポリペプチドの塩が含まれ、さらには糖鎖を有しないものと糖鎖を有するものとの両方が含まれる。

[0013] ここで、機能的に等価な改変ポリペプチド(以下、「改変ポリペプチド」と称する)とは、そのアミノ酸配列が、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドにおいて1または複数個(好ましくは1または数個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列であって、しかもリラキシナー3と実質的に同じ活性[例えばリラキシナー3受容体との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性(例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍pH

変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosおよびc-junの誘導活性、アラキドン酸遊離など)、摂食亢進作用、体重増加作用または肥満作用]を有するポリペプチドを意味する。

- [0014] 本明細書において「置換」とは、ペプチドの活性を実質的に改変しないように、1または複数個のアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該技術分野において公知である。具体例を挙げると、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン等が挙げられる。極性(中性)アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システイン等が挙げられる。陽電荷をもつ(塩基性)アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジン等が挙げられる。また、負電荷をもつ(酸性)アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

ここで、欠失、置換、挿入および/または付加されてもよいアミノ酸の数は、例えば1〜30個、好ましくは1〜20個、より好ましくは1〜10個、さらに好ましくは1〜5個、特に好ましくは1〜2個である。なお、前記改変ポリペプチドには、改変ポリペプチドの塩が含まれ、さらには糖鎖を有しないものと糖鎖を有するものとの両方が含まれる。従って、これらの条件を満たす限り、前記改変ポリペプチドの起源は、ヒトに限定されない。例えばヒト以外の生物[例えば非ヒト哺乳動物(例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど)、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など]由来のリラキシナー3もしくはその変異体が含まれる。

- [0015] 上述の相同ポリペプチドとは、リラキシナー3のアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる限り、特に限定されるものではないが、リラキシナー3に関して、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、そして最も好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアミノ酸配列であって、しかもリラキシナー3と実質的に同じ活性(例えばリラキシナー3受容体との結合能およびそれにより

生じる種々の細胞刺激活性、摂食亢進作用、体重増加作用または肥満作用)を有するポリペプチドを意味する。本明細書において、「相同性」の数値はいずれも、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であればよく、例えば全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI)の相同性アルゴリズムBLAST(Basic local alignment search tool)<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>においてデフォルト(初期設定)のパラメーターを用いることにより、算出することができる。なお、前記相同ポリペプチドには、相同ポリペプチドの塩が含まれ、さらには糖鎖を有しないものと糖鎖を有するものとの両方が含まれる。従って、これらの条件を満たす限り、前記相同ポリペプチドの起源は、ヒトに限定されない。例えばヒト以外の生物[例えば非ヒト哺乳動物(例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど)、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など]由来のリラキシニン-3もしくはその変異体が含まれる。

[0016] なお、変異体とは、「variation」、すなわち、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

[0017] これら本発明に使用するリラキシニン-3(すなわち、リラキシニン-3、改変ポリペプチド、相同ポリペプチド)は、種々の公知の方法、例えば遺伝子工学的手法、合成法などによって得ることができる。具体的には、遺伝子工学的手法の場合、リラキシニン-3をコードするポリヌクレオチドを適当な宿主細胞に導入し、得られた形質転換体から発現可能な条件下で培養し、発現タンパク質の分離および精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から所望のポリペプチドを分離および精製することによって調製することができる。また、合成法の場合は、液相法、固相法など常法に従い合成することが可能であり、通常、自動合成機を利用することができる。化学修飾物の合成は常法により行なうことができる。また、使用するポリペプチドは配列番号2の全長および一部でも良く、システイン間の架橋や、N末端環状グルタミン化、C末端アミド化等、分泌タンパクのプロセッシングを受けた形のポリペプチドでも良い。

[0018] リラキシニン-3をコードするポリヌクレオチド

本発明に使用するリラキシニン-3をコードするポリヌクレオチドは、本発明に使用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである限り、特に限定されるものではない。

なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNAおよびRNAの両方が含まれる。本発明に使用するポリヌクレオチドには、具体的には下記の(a)～(e)からなる群より選択されるものが挙げられる。

- (a) 配列番号1で表される塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；
- (b) 「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；
- (c) 「配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、前記のリラキシシン-3と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；
- (d) 「配列番号2で表されるアミノ酸配列の1または複数個（好ましくは1または数個）の箇所において、1または複数個（好ましくは1または数個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記のリラキシシン-3と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；および
- (e) 「配列番号1で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記のリラキシシン-3と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチドに関する。

[0019] 本発明の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列の1または複数個（好ましくは1または数個）の箇所において、1または複数個（好ましくは1または数個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記のリラキシシン-3と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。ここで、欠失、置換、挿入および／または付加されてもよいアミノ酸の数は、例えば1～30個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、特に好ましくは1～2個である。

[0020] 本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号1で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記のリラキシシン-3と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。

[0021] 本明細書において、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドとは、具体的には、FASTA、BLAST、Smith-Waterman〔Meth. Enzym., 164

、765 (1988)]等の相同性検索ソフトウェアにより、デフォルト(初期設定)のパラメーターを用いて計算したときに、配列番号1で表される塩基配列と少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、そして最も好ましくは99%以上の相同性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。また、「ストリンジেন্টな条件下」とは、当業者が通常使用し得るハイブリダイゼーション緩衝液中で、温度が40℃～70℃、好ましくは60℃～65℃などで反応を行い、塩濃度が15～300mmol/L、好ましくは15～60mmol/Lなどの洗浄液中で洗浄する方法に従って行なうことができる。温度、塩濃度は使用するプローブの長さに応じて適宜調整することが可能である。

[0022] 本発明に使用するポリヌクレオチドは、例えば天然由来のものであることもできるし、または全合成したものであることもできる。さらには、天然由来のものの一部を利用して合成を行なったものであることもできる。本発明に使用するポリヌクレオチドの典型的な取得方法としては、例えば市販のライブラリーまたはcDNAライブラリーから、遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば部分アミノ酸配列(例えば配列番号2で表されるアミノ酸配列)の情報を基にして作成した適当なDNAプローブを用いてスクリーニングを行なう方法などを挙げることができる。

[0023] 本発明に使用するポリヌクレオチドとしては、「配列番号1で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド」が好ましい。配列番号1で表される塩基配列は、1番目～3番目のATGで始まり、427番目～429番目のTAGで終了するオープンリーディングフレームを有する。

[0024] リラキシン-3を含有する医薬組成物

本発明に使用するリラキシン-3は、摂食亢進剤として食欲不振や摂食量が低下した栄養障害などの治療、体重増加剤、脂肪量増加剤として体重増加を必要とする疾患の治療、肥満調節における何らかの異常に起因する疾患の治療、およびリラキシン-3またはリラキシン-3をコードするポリヌクレオチドの異常等に起因する疾患の治療の医薬として用いることができる。また、各種疾患の発症もしくは各種疾患の治療(例えば術中、術後)に伴い減少した摂食(もしくは食欲)および/または体重の回復

を目的とする治療の医薬として用いることもできる。前記各種疾患は、例えば消化管の運動もしくは機能に係る疾患(例えば下痢、便秘、機能性便秘症、過敏性腸症候群、消化管検査時または手術前後における腸管内容物排除のための排便促進など)、免疫機能調節に係る疾患(例えば慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、腎疾患、強皮症、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、多発性硬化症、リウマチ性間質性肺炎、サルコイドーシス、クローン病、炎症性大腸炎、肝硬変、慢性肝炎、劇症肝炎、脳脊髄炎、重症筋無力症など)、摂食障害、拒食症、AIDS、癌、または悪液質などが挙げられる。好ましくは、拒食症、悪液質が挙げられる。

[0025] 当該ポリペプチドまたはその塩を単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもできる。

本願明細書における「塩」とは、本発明に係る化合物と塩を形成し、かつ薬学的に許容され得る塩であれば特に限定されないが、好ましくはハロゲン化水素酸塩(例えばフッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩など)、無機酸塩(例えば硫酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、リン酸塩、炭酸塩、重炭酸塩など)有機カルボン酸塩(例えば酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩など)、有機スルホン酸塩(例えばメタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、カンファースルホン酸塩など)、アミノ酸塩(例えばアスパラギン酸塩、グルタミン酸塩など)、四級アミン塩、アルカリ金属塩(例えばナトリウム塩、カリウム塩など)、アルカリ土類金属塩(マグネシウム塩、カルシウム塩など)などが挙げられ、当該「薬学的に許容され得る塩」として、より好ましくは塩酸塩、シュウ酸塩、などである。

この時の有効成分の担体に対する割合は、1〜90重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は、ヒトまたはヒト以外の生物[例えば非ヒト哺乳動物(例えばウシ、サル、トリ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど)、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など]に、種々の形態、経口または非経口(例えば静脈注射、筋肉注射、皮下投与、直腸投与、経皮投与)のいずれかの投与経路で投与することができる。従って、本発明のリラキシン-3を含有する医薬組成物は、投与経路に応じて適当な剤形とされ、具体的には錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による

経口剤、または注射剤、点滴剤、リボソーム剤、坐薬剤等による非経口剤を挙げることができる。これらの製剤は通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性化剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤等を用いて常法により製造することができる。使用可能な無毒性の上記添加剤としては、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、デンプン、ゼラチン、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、またはその塩、エタノール、クエン酸、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

- [0026] それらの投与形態としては、また、必要な投与量範囲は、ポリペプチドの選択、投与対象、投与経路、製剤の性質、患者の状態、そして医師の判断に左右される。しかし、適当な投与量は患者の体重1kgあたり例えば約0.1〜500 μ g、好ましくは約0.1〜100 μ g、より好ましくは1〜50 μ g程度を投与するのが好ましい範囲である。投与経路の効率が異なることを考慮すれば、必要とされる投与量は広範に変動することが予測される。例えば経口投与は静脈注射による投与よりも高い投与量を必要とすると予想される。こうした投与量レベルの変動は、当業界でよく理解されているような、標準的経験的な最適化手順を用いて調整することができる。

[0027] リラキシニン-3受容体を用いた摂食調節に係る化合物のスクリーニング方法

本発明に使用するリラキシニン-3に対する受容体としては、種々の受容体のうち、本発明に使用するリラキシニン-3と結合活性を有し、リラキシニン-3受容体発現細胞の細胞刺激活性(例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍pH変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosおよびc-junの誘導活性、アラキドン酸遊離など)を有するものを使用することができる。

- [0028] 具体的には、リラキシニン-3受容体として、報告されている公知の受容体、例えばLGR7(GenBankアクセッション番号NM_021634)、SALPR(GenBankアクセッション番号NM_016568)(GPCR135とも称されている。)またはGPR100(GenBankアクセッション番号AB_083593)(hGPCR11、GPCR142とも称されている。)などを使用することが可能である。また、これら受容体の部分ポリペプチドとして後述のスクリーニング方法に使用可能であれば特に限定されず、例えばリラキシニン-3に

対する結合能を有する部分ポリペプチド、細胞膜外領域に相当するアミノ酸配列を含む部分ポリペプチドなども使用することもできる。

- [0029] 以下、本明細書においては、本発明の好ましい一例として、SALPRを使用するスクリーニング方法について本発明の内容を詳述する。すなわち、本発明は、SALPRまたはその部分ポリペプチドに結合し、摂食調節(摂食を促進または抑制する)に係る化合物のスクリーニング方法を提供するものである。また、SALPRまたはその部分ポリペプチドに被験物質を作用させ、細胞刺激活性を測定することにより、該被験物質に摂食を促進または抑制する作用を有するか否かを決定することができる。
- [0030] ここで、本発明に使用するSALPRまたはその部分ポリペプチドは、種々の公知の方法により得ることができ、例えばSALPRをコードするポリヌクレオチド(GenBankアクセス番号NM_016568)を用いて公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。また別の態様として、公知のポリペプチドの合成法により得ることができ、例えば液相法、固相法など常法に従い合成することが可能であり、通常、自動合成機を利用することができる。さらに、別の態様によれば、SALPRの部分ポリペプチドは、SALPRを適当なタンパク質分解酵素で切断することによって調製することができる。
- [0031] 本発明に使用するSALPRをコードするポリペプチドは、配列番号4で表されるアミノ酸を含むポリペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸を含むポリペプチドと機能的に等価な改変ポリペプチド、または配列番号4で表されるアミノ酸配列に関して、70%以上の相同性、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、そして最も好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアミノ酸配列であって、しかもSALPRと実質的に同じ活性(例えばリラキシニン-3との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性、または摂食調節作用)を有するポリペプチドを意味する。
- [0032] ここで、配列番号4で表されるアミノ酸を含むポリペプチドと機能的に等価な改変ポリペプチドとは、そのアミノ酸配列が、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドにおいて1または複数個(好ましくは1または数個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列であって、しかもSALPRと実質的に同じ

活性(例えばリラキシン-3との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性、または摂食調節作用)を有するポリペプチドを意味する。

- [0033] さらに、SALPRの部分ポリペプチドも、SALPRと実質的に同じ活性(例えばリラキシン-3との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性、または摂食調節作用)を有する限り、使用することができる。
- [0034] 以下、遺伝子工学的手法について、より具体的にはSALPRを使用する場合について詳述するが、その部分ポリペプチドについても、後述のスクリーニング方法に使用可能であれば特に限定されない。
- [0035] SALPRをコードするポリヌクレオチドを適当な宿主細胞に導入し、得られた形質転換体から発現可能な条件下で培養し、発現タンパク質の分離および精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から所望のポリペプチドを分離および精製することにより調製することができる。前記の分離および精製方法としては、例えば硫酸塩析、イオン交換セルロースを用いるイオン交換カラムクロマトグラフィー、分子篩ゲルを用いる分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテインA結合多糖類を用いる親和性カラムクロマトグラフィー、透析、または凍結乾燥等を挙げることができる。
- [0036] 本発明に使用するSALPRをコードするポリヌクレオチドは、本発明に使用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである限り、特に限定されるものではない。
- なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNAおよびRNAの両方が含まれる。本発明に使用するポリヌクレオチドには、具体的には下記の(a)〜(e)からなる群より選択されるものが挙げられる。
- (a) 配列番号3で表される塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；
 - (b) 「配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；
 - (c) 「配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；
 - (d) 「配列番号4で表されるアミノ酸配列の1または複数個(好ましくは1または数個)の箇所において、1または複数個(好ましくは1または数個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記SALPRと実質的

に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド;および
(e)「配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチドに関する。

- [0037] 本発明の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドである。配列番号3で表される前記ポリヌクレオチドは、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるSALPRをコードする。
- [0038] 本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号4で表されるアミノ酸配列の1または複数個(好ましくは1または数個)の箇所において、1または複数個(好ましくは1または数個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。ここで、欠失、置換、挿入および/または付加されてもよいアミノ酸の数は、例えば1〜30個、好ましくは1〜20個、より好ましくは1〜10個、さらに好ましくは1〜5個、特に好ましくは1〜2個である。
- [0039] 本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。さらに、本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。
- [0040] 前記形質転換に使用されるプラスミドは、上記のようなSALPRをコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、当該ポリヌクレオチドを挿入することにより得られるプラスミドを挙げることができる。
- [0041] また、前記形質転換体も、上記のようなSALPRをコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば当該ポリヌクレオチドが宿主細胞の染色体に組み込まれた形質転換体であることもできるし、あるいは、当該ポリヌクレオチドを

含むプラスミドの形で含有する形質転換体であることもできるし、あるいは、SALPRを発現していない形質転換体であることもできる。当該形質転換体は、例えば前記プラスミドにより、あるいは、前記ポリヌクレオチドそれ自体により、所望の宿主細胞を形質転換することにより得ることができる。

- [0042] 前記宿主細胞としては、例えば通常使用される公知の微生物、例えば大腸菌(例えば*Escherichia coli* JM109株)または酵母(例えば*Saccharomyces cerevisiae* W303株)、あるいは、公知の培養細胞、例えば動物細胞(例えばCHO細胞、HEK-293細胞、またはCOS細胞)または昆虫細胞(例えばBmN4細胞)を挙げることができる。
- [0043] また、公知の前記発現ベクターとしては、例えば大腸菌に対しては、pUC、pTV、pGEX、pKK、またはpTrcHisを;酵母に対しては、pEMBLYまたはpYES2を;CHO細胞、HEK-293細胞およびCOS細胞に対しては、pcDNA3、pMAMneoまたはpBabe Puroを;BmN4細胞に対しては、カイコ核多角体ウイルス(BmNPV)のポリヘドリンプロモーターを有するベクター(例えばpBK283)を挙げることができる。
- [0044] SALPRを含有する細胞は、SALPRを細胞膜表面に発現している限り、特に限定されるものではなく、例えば前記形質転換体(すなわち、SALPRをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドで形質転換された細胞)を、SALPRの発現が可能な条件下で培養することにより得ることもできるし、あるいは、適当な細胞に、SALPRをコードするRNAを注入し、SALPRの発現が可能な条件下で培養することにより得ることもできる。
- [0045] また、SALPRを含有する本発明に使用する細胞膜画分は、例えば本発明によるSALPRを発現する細胞を破碎した後、細胞膜が多く含まれる画分を分離することにより得ることができる。細胞の破碎方法としては、例えばホモジナイザー(例えばPotter-Elvehjem型ホモジナイザー)で細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーまたはポリトロン(Kinematica社)による破碎、超音波による破碎、あるいは、フレンチプレスなどで加圧しながら細いソズルから細胞を噴出させることによる破碎などを挙げることができる。また、細胞膜の分画方法としては、例えば遠心力による分画法、例えば分画遠心分離法または密度勾配遠心分離法を挙げることができる。

- [0046] SALPRを介する、本発明による摂食を促進または抑制する化合物のスクリーニング方法では、SALPRもしくは前記細胞膜画分(すなわち、SALPRを含有する細胞膜画分)、または前記細胞(すなわち、SALPRを含有する細胞)を用いることができる。
- [0047] また、本発明によるスクリーニング方法においては、被験物質がSALPRに特異的に結合するか否かを調べる方法と、SALPRに被験物質が結合することにより生じる細胞刺激活性(例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍pH変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosおよびc-junの誘導活性、アラキドン酸遊離など)を調べる方法とが挙げられ、それらを利用することができる。
- [0048] 本発明によるスクリーニング方法においては、例えばSALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、被験物質とを接触させ、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、被験物質が結合するか否かを分析することにより、SALPRを介する摂食を促進または抑制する能力を区別せずに化合物をスクリーニングすることができる。
- [0049] 具体的には、被験物質非存在下および被験物質存在下の各条件下において、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、標識した天然のリガンド(すなわち、リラキシニン-3)とを接触させ、前記条件下におけるSALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞を介する前記天然リガンドの特異的結合量を比較することにより、SALPRを介する摂食を促進または抑制する能力を区別せずに化合物をスクリーニングすることができる。すなわち、前記被験物質が、SALPRを介する摂食を促進または抑制する能力を有する場合には、被験物質非存在下におけるSALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞を介する天然リガンドの特異的結合量に対して、被験物質存在下における前記特異的結合量が低下する。
- [0050] 本発明によるスクリーニング方法において、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞を介する前記天然リガンドの特異的結合量を比較する場合には、前記天然リガンドとして、標識した天然リガンドを用いることができる。前記指標としては、例え

ば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などを用いることができる。前記酵素としては、例えば β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼなどを用いることができる。蛍光物質としては、例えばフルオレセインチオシアネート、BODIPYなどを用いることができる。発光物質としてはルシフェリン、ルシゲニンなどを用いることができる。場合によっては、天然リガンドと標識物質を結合させるためにビオチン-アビジンの系を用いることもできる。

[0051] このように、本発明によるスクリーニング方法において、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞に結合して、これらと天然リガンドとの結合を阻害する化合物を、SALPRを介する摂食を促進または抑制する能力を区別せずにスクリーニングすることができる。

[0052] 本発明によるスクリーニング方法における別の態様では、被験物質非存在下および被験物質存在下の各条件下において、前記細胞と標識化した天然のリガンド(すなわち、リラキシン-3)とを接触させ、前記各条件下における前記細胞を介する前記天然リガンドの特異的結合量を比較し、さらに、前記条件下における前記天然リガンドの特定の細胞刺激活性を比較することにより、SALPRを介する摂食を促進または抑制する能力を区別して化合物をスクリーニングすることができる。

[0053] 前記態様においては、前記細胞に結合し、前記細胞に含まれる受容体を介して細胞刺激活性を有する被験物質を、SALPRを介する摂食を促進する化合物として選択することができる。

[0054] 一方、前記態様において、前記細胞と天然リガンドとの結合を阻害するものの、細胞刺激活性を有しない被験物質を、SALPRを介する摂食を抑制する化合物として選択することができる。

[0055] 本発明によるスクリーニング方法は、細胞刺激活性として、例えばアデニル酸シクラーゼの活性抑制を利用することによって実施することができる。

[0056] この態様のスクリーニング方法においては、例えばアデニル酸シクラーゼの活性化によって細胞内に生成するcAMPを公知の手法で測定すればよく、SALPRを介する摂食を促進または抑制する能力を区別して化合物をスクリーニングすることができる。

る。この態様は、SALPRに天然リガンドが結合することにより生じる細胞内シグナル伝達、すなわち、SALPRの細胞刺激活性の一つであるアデニル酸シクラーゼの活性抑制を利用するものである。具体的には、SALPRに天然リガンドが結合すると、SALPRに共役しているGタンパク質ファミリーの一つであるGiファミリーが、アデニル酸シクラーゼを抑制し、細胞内に生成されるサイクリックAMP(cAMP:アデニル酸シクラーゼによりATPから生成される)量を減少させることによる。

- [0057] 例えばSALPRを細胞膜上に発現(好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入し過剰に発現)した哺乳動物由来細胞(例えばHEK-293細胞もしくはCHO細胞)にアデニル酸シクラーゼの活性化剤[例えばフォルスコリン(FSK)]を添加すると、細胞内のcAMPの濃度が上昇する。
- [0058] また、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を添加する際に、SALPRの天然リガンドを加えると、アデニル酸シクラーゼ活性化剤に起因する前記のアデニル酸シクラーゼ活性促進に加え、前記天然リガンドが本発明によるSALPRに作用して生じるアデニル酸シクラーゼの活性抑制も起こるため、結果として、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独投与した場合に比べて、cAMPの生成量が減少する。従って、摂食を促進する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、このスクリーニング系でSALPRを介する天然のリガンドに代わり、被験物質を単独で接触させてcAMPの生成量を減少させる(すなわち天然リガンドと同様の作用を有する)化合物を選択すると良い。
- [0059] 摂食を抑制する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、アデニル酸シクラーゼ活性化剤、SALPRの天然リガンド、および被験物質をスクリーニング用細胞に添加するとよい。アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独で添加した場合に比べて、天然リガンドの作用でcAMPの生成量が減少するが、被験物質が天然リガンドの作用に拮抗する場合には、cAMP生成量の減少を抑制する。このときには、前記被験物質は摂食抑制作用を有する化合物として選択できる。
- [0060] 細胞内cAMP量を測定する方法としては、例えばイムノアッセイ等があるが、例えば市販のcAMP定量キットを使用することもできる。
- [0061] 別の態様のスクリーニング方法においては、例えばSALPRを細胞膜上に発現(好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入し過剰に発現)し、しかも、cAMP応答

配列(CRE)が5'上流に位置するレポーター遺伝子(例えばアルカリフォスファターゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、ベータラクタマーゼ遺伝子、ニトロレダクターゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、ベータガラクトシダーゼ遺伝子等、またはGFP(Green Fluorescent Protein)等の蛍光タンパク質遺伝子等)を含有する細胞(以下、「スクリーニング用細胞」と称することもある)を用いることにより、SALPRを介する摂食を促進または抑制する能力を区別して化合物をスクリーニングすることができる。この態様は、前述のcAMPの生成が減少するとその結果、前記スクリーニング用細胞に導入されているCREをプロモーター領域に有するレポーター遺伝子の転写が抑制されることを利用している。

[0062] 以下、前記態様による、SALPRを介する摂食を促進または抑制する能力を区別して化合物をスクリーニングする手順について、より具体的に説明する。

すなわち、前記スクリーニング用細胞に導入されているCREは、細胞内のcAMPの濃度が上昇すると発現が亢進する遺伝子群(cAMP誘導性遺伝子)の転写調節領域に共通して存在する塩基配列である。従って、アデニル酸シクラーゼの活性化剤(例えばFSK)をスクリーニング用細胞に添加すると、細胞内のcAMPの濃度が上昇し、その結果、CREの下流に位置するレポーター遺伝子の発現量が増加する。レポーター遺伝子産物の発現量は、レポーター遺伝子産物と反応し基質から生成した発光物質の量に由来する発光を測定することによりもしくはレポーター遺伝子として産生された蛍光タンパク質由来の蛍光を測定することで容易に測定することが可能である。

[0063] また、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を添加する際に、SALPRの天然リガンドを加えると、アデニル酸シクラーゼ活性化剤に起因する前記のアデニル酸シクラーゼ活性促進に加え、前記天然リガンドが本発明によるSALPRに作用して生じるアデニル酸シクラーゼの活性抑制も起こるため、結果として、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独投与した場合に比べて、レポーター遺伝子産物の発現量が低下する。従って、摂食を促進する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、このスクリーニング系で、SALPRを介する天然のリガンドに代わり被験物質を単独で接触させてレポーター遺伝子産物の発現量を減少させる(すなわち天然リガンドと同様の作用を有

する)化合物を選択すると良い。

- [0064] 摂食を抑制する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、アデニル酸シクラーゼ活性化剤、SALPRの天然リガンド、および被験物質をスクリーニング用細胞に添加するとよい。アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独で添加した場合に比べて、天然リガンドの作用でレポーター遺伝子産物の発現量は減少するが、被験物質が天然リガンドの作用に拮抗する場合には、レポーター遺伝子産物の発現減少を抑制する。このときには、前記被験物質は摂食抑制作用を有する化合物として選択できる。
- [0065] 被験物質による作用が、SALPRに対する結合を介した作用であるか否かは、簡単に確認することができる。例えばスクリーニング用細胞(すなわち、SALPRを細胞膜上に発現し、しかも、CREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含む細胞)を用いた前記試験と並行して、コントロール用細胞(例えばCREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含むものの、SALPRを細胞膜上に発現していない細胞)を用いて同様の試験を実施する。その結果、前記被験物質による作用が、SALPRに対する結合による作用でない場合には、スクリーニング用細胞およびコントロール用細胞でレポーター遺伝子産物の発現量に関して同じ現象が観察されるのに対して、前記被験物質による作用が、SALPRに対する結合による作用である場合には、スクリーニング用細胞とコントロール用細胞とでレポーター遺伝子産物の発現量に関して異なる現象が観察される。
- [0066] また、別の態様として、上記のスクリーニング方法により選択された被験物質をヒモまたはヒト以外の生物[例えば非ヒト哺乳動物(例えばウシ、サル、トリ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど)、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など]に投与し、投与後の摂食量や血中パラメーターの変動等の指標を解析することにより摂食調節に影響を与える被験物質を確認および決定することができる。上記哺乳動物としては、正常の動物に限らず、遺伝性の病態モデル動物(例えば肥満病モデルであるob/obマウス、db/dbマウス、Zucker fattyラットなど)や遺伝子改変動物でもよい。被験物質の投与形態としては経口的または非経口的に投与する。非経口的な投与経路の様態としては、例えば静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、気道内、直腸内、脳

内、好ましくは視床下部近傍の脳室内投与が挙げられる。スクリーニングのための指標としては摂食量のほかにも、例えば体重、運動量、エネルギー代謝量、血中の糖および脂質の量、またはホルモンや分泌ペプチドの量等を測定することも有効である。また、投与の際に絶食もしくは飽食、さらに脂質過剰食等の条件を課すこともできる。

被験物質の投与回数は1日あたり一回でも数回に分けても良く、被験物質を投与する期間や観察する期間は1日から数週間にわたってもよい。

[0067] リラキシニン-3受容体を用いた体重調節に係る化合物のスクリーニング方法

本発明に使用するリラキシニン-3に対する受容体としては、種々の受容体のうち、本発明に使用するリラキシニン-3と結合活性を有し、リラキシニン-3受容体発現細胞の細胞刺激活性(例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍pH変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosおよびc-junの誘導活性、アラキドン酸遊離など)を有するものを使用することができる。

[0068] 具体的には、リラキシニン-3受容体として、報告されている公知の受容体、例えばLGR7(GenBankアクセッション番号NM_021634)、SALPR(GenBankアクセッション番号NM_016568)(GPCR135とも称されている。)またはGPR100(GenBankアクセッション番号AB_083593)(hGPCR11、GPCR142とも称されている。)などを使用することが可能である。また、これら受容体の部分ポリペプチドとして後述のスクリーニング方法に使用可能であれば特に限定されず、例えばリラキシニン-3に対する結合能を有する部分ポリペプチド、細胞膜外領域に相当するアミノ酸配列を含む部分ポリペプチドなども使用することもできる。

[0069] 以下、本明細書においては、本発明の好ましい一例として、SALPRを使用するスクリーニング方法について本発明の内容を詳述する。すなわち、本発明は、SALPRまたはその部分ポリペプチドに結合し、体重調節(体重を増加または減少する)に係る化合物のスクリーニング方法を提供するものである。また、SALPRまたはその部分ポリペプチドに被験物質を作用させ、細胞刺激活性を測定することにより、該被験物質に体重を増加または減少する作用を有するか否かを決定することができる。

- [0070] ここで、本発明に使用するSALPRまたはその部分ポリペプチドは、種々の公知の方法により得ることができ、例えばSALPRをコードするポリヌクレオチド(GenBankアクセッション番号NM_016568)を用いて公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。また別の態様として、公知のポリペプチドの合成法により得ることができ、例えば液相法、固相法など常法に従い合成することが可能であり、通常、自動合成機を利用することができる。さらに、別の態様によれば、SALPRの部分ポリペプチドは、SALPRを適当なタンパク質分解酵素で切断することによって調製することができる。
- [0071] 本発明に使用するSALPRをコードするポリペプチドは、配列番号4で表されるアミノ酸を含むポリペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸を含むポリペプチドと機能的に等価な改変ポリペプチド、または配列番号4で表されるアミノ酸配列に関して、70%以上の相同性、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、そして最も好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアミノ酸配列であって、しかもSALPRと実質的に同じ活性(例えばリラキシナー3との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性、または体重調節作用)を有するポリペプチドを意味する。
- [0072] ここで、配列番号4で表されるアミノ酸を含むポリペプチドと機能的に等価な改変ポリペプチドとは、そのアミノ酸配列が、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドにおいて1または複数個(好ましくは1または数個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列であって、しかもSALPRと実質的に同じ活性(例えばリラキシナー3との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性、または体重調節作用)を有するポリペプチドを意味する。
- [0073] さらに、SALPRの部分ポリペプチドも、SALPRと実質的に同じ活性(例えばリラキシナー3との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性、または体重調節作用)を有する限り、使用することができる。
- [0074] 以下、遺伝子工学的手法について、より具体的にはSALPRを使用する場合について詳述するが、その部分ポリペプチドについても後述のスクリーニング方法に使用可能であれば特に限定されない。

[0075] SALPRをコードするポリヌクレオチドを適当な宿主細胞に導入し、得られた形質転換体から発現可能な条件下で培養し、発現タンパク質の分離および精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から所望のポリペプチドを分離および精製することにより調製することができる。前記の分離および精製方法としては、例えば硫酸塩析、イオン交換セルロースを用いるイオン交換カラムクロマトグラフィー、分子篩ゲルを用いる分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテインA結合多糖類を用いる親和性カラムクロマトグラフィー、透析、または凍結乾燥等を挙げることができる。

[0076] 本発明に使用するSALPRをコードするポリヌクレオチドは、本発明に使用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである限り、特に限定されるものではない。

なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNAおよびRNAの両方が含まれる。本発明に使用するポリヌクレオチドには、具体的には下記の(a)〜(e)からなる群より選択されるものが挙げられる。

(a)配列番号3で表される塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；

(b)「配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；

(c)「配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；

(d)「配列番号4で表されるアミノ酸配列の1または複数個（好ましくは1または数個）の箇所において、1または複数個（好ましくは1または数個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；および

(e)「配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチドに関する。

[0077] 本発明の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドである。配列番号3で表される前記ポリヌクレオチドは、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるSALPRをコードする。

[0078] 本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列

番号4で表されるアミノ酸配列の1または複数個(好ましくは1または数個)の箇所において、1または複数個(好ましくは1または数個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。ここで、欠失、置換、挿入および/または付加されてもよいアミノ酸の数は、例えば1〜30個、好ましくは1〜20個、より好ましくは1〜10個、さらに好ましくは1〜5個、特に好ましくは1〜2個である。

[0079] 本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。さらに、本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。

[0080] 前記形質転換に使用されるプラスミドは、上記のようなSALPRをコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、当該ポリヌクレオチドを挿入することにより得られるプラスミドを挙げることができる。

[0081] また、前記形質転換体も、上記のようなSALPRをコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば当該ポリヌクレオチドが宿主細胞の染色体に組み込まれた形質転換体であることもできるし、あるいは、当該ポリヌクレオチドを含むプラスミドの形で含有する形質転換体であることもできるし、あるいは、SALPRを発現していない形質転換体であることもできる。当該形質転換体は、例えば前記プラスミドにより、あるいは、前記ポリヌクレオチドそれ自体により、所望の宿主細胞を形質転換することにより得ることができる。

[0082] 前記宿主細胞としては、例えば通常使用される公知の微生物、例えば大腸菌(例えば*Escherichia coli* JM109株)または酵母(例えば*Saccharomyces cerevisiae* W303株)、あるいは、公知の培養細胞、例えば動物細胞(例えばCHO細胞、HEK-293細胞、またはCOS細胞)または昆虫細胞(例えばBmN4細胞)を挙げること

ができる。

- [0083] また、公知の前記発現ベクターとしては、例えば大腸菌に対しては、pUC、pTV、pGEX、pKK、またはpTrcHisを；酵母に対しては、pEMBL YまたはpYES2を；CHO細胞、HEK-293細胞およびCOS細胞に対しては、pcDNA3、pMAMneoまたはpBabe Puroを；BmN4細胞に対しては、カイコ核多角体ウイルス(BmNPV)のポリヘドリンプロモーターを有するベクター(例えばpBK283)を挙げることができる。
- [0084] SALPRを含有する細胞は、SALPRを細胞膜表面に発現している限り、特に限定されるものではなく、例えば前記形質転換体(すなわち、SALPRをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドで形質転換された細胞)を、SALPRの発現が可能な条件下で培養することにより得ることもできるし、あるいは、適当な細胞に、SALPRをコードするRNAを注入し、SALPRの発現が可能な条件下で培養することにより得ることもできる。
- [0085] また、SALPRを含有する本発明に使用する細胞膜画分は、例えば本発明によるSALPRを発現する細胞を破碎した後、細胞膜が多く含まれる画分を分離することにより得ることができる。細胞の破碎方法としては、例えばホモジナイザー(例えばPotter-Elvehjem型ホモジナイザー)で細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーまたはポリロン(Kinematica社)による破碎、超音波による破碎、あるいは、フレンチプレスなどで加圧しながら細いノズルから細胞を噴出させることによる破碎などを挙げることができる。また、細胞膜の分画方法としては、例えば遠心力による分画法、例えば分画遠心分離法または密度勾配遠心分離法を挙げることができる。
- [0086] SALPRを介する、本発明による体重を増加または減少する化合物のスクリーニング方法では、SALPRもしくは前記細胞膜画分(すなわち、SALPRを含有する細胞膜画分)、または前記細胞(すなわち、SALPRを含有する細胞)を用いることができる。
- [0087] また、本発明によるスクリーニング方法においては、被験物質がSALPRに特異的に結合するか否かを調べる方法と、SALPRに被験物質が結合することにより生じる細胞刺激活性(例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位

変化、細胞膜近傍pH変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosおよびc-junの誘導活性、アラキドン酸遊離など)を調べる方法とが挙げられ、それらを利用することができる。

- [0088] 本発明によるスクリーニング方法においては、例えばSALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、被験物質とを接触させ、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、被験物質が結合するか否かを分析することにより、SALPRを介する体重を増加または減少する能力を区別せずに化合物をスクリーニングすることができる。
- [0089] 具体的には、被験物質非存在下および被験物質存在下の各条件下において、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、標識した天然のリガンド(すなわち、リラキシニン-3)とを接触させ、前記条件下におけるSALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞を介する前記天然リガンドの特異的結合量を比較することにより、SALPRを介する体重を増加または減少する能力を区別せずに化合物をスクリーニングすることができる。すなわち、前記被験物質が、SALPRを介する体重を増加または減少する能力を有する場合には、被験物質非存在下におけるSALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞を介する天然リガンドの特異的結合量に対して、被験物質存在下における前記特異的結合量が低下する。
- [0090] 本発明によるスクリーニング方法において、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞を介する前記天然リガンドの特異的結合量を比較する場合には、前記天然リガンドとして、標識した天然リガンドを用いることができる。前記指標としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などを用いることができる。前記酵素としては、例えば β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼなどを用いることができる。蛍光物質としては、例えばフルオレセイン、チオシアネート、BODIPYなどを用いることができる。発光物質としてはルシフェリン、ルシゲニンなどを用いることができる。場合によっては、天然リガンドと標識物質を結合させるためにビオチン-アビジンの系を用いることもできる。
- [0091] このように、本発明によるスクリーニング方法において、SALPRもしくは前記細胞膜

画分または前記細胞に結合して、これらと天然リガンドとの結合を阻害する化合物を、SALPRを介する体重を増加または減少する能力を区別せずにスクリーニングすることができる。

- [0092] 本発明によるスクリーニング方法における別の態様では、被験物質非存在下および被験物質存在下の各条件下において、前記細胞と標識化した天然のリガンド(すなわち、リラキシニン-3)とを接触させ、前記各条件下における前記細胞を介する前記天然リガンドの特異的結合量を比較し、さらに、前記条件下における前記天然リガンドの特定の細胞刺激活性を比較することにより、SALPRを介する体重を増加または減少する能力を区別して化合物をスクリーニングすることができる。
- [0093] 前記態様においては、前記細胞に結合し、前記細胞に含まれる受容体を介して細胞刺激活性を有する被験物質を、SALPRを介する体重を増加する化合物として選択することができる。
- [0094] 一方、前記態様において、前記細胞と天然リガンドとの結合を阻害するものの、細胞刺激活性を有しない被験物質を、SALPRを介する体重を減少する化合物として選択することができる。
- [0095] 本発明によるスクリーニング方法は、細胞刺激活性として、例えばアデニル酸シクラーゼの活性抑制を利用することによって実施することができる。
- [0096] この態様のスクリーニング方法においては、例えばアデニル酸シクラーゼの活性化によって細胞内に生成するcAMPを公知の手法で測定すればよく、SALPRを介する体重を増加または減少する能力を区別して化合物をスクリーニングすることができる。この態様は、SALPRに天然リガンドが結合することにより生じる細胞内シグナル伝達、すなわち、SALPRの細胞刺激活性の一つであるアデニル酸シクラーゼの活性抑制を利用するものである。具体的には、SALPRに天然リガンドが結合すると、SALPRに共役しているGタンパク質ファミリーの一つであるGiファミリーが、アデニル酸シクラーゼを抑制し、細胞内に生成されるサイクリックAMP(cAMP:アデニル酸シクラーゼによりATPから生成される)量を減少させることによる。
- [0097] 例えばSALPRを細胞膜上に発現(好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入し過剰に発現)した哺乳動物由来細胞(例えばHEK-293細胞もしくはCHO細胞

)にアデニル酸シクラーゼの活性化剤[例えばフォルスコリン(FSK)]を添加すると、細胞内のcAMPの濃度が上昇する。

- [0098] また、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を添加する際に、SALPRの天然リガンドを加えると、アデニル酸シクラーゼ活性化剤に起因する前記のアデニル酸シクラーゼ活性促進に加え、前記天然リガンドが本発明によるSALPRに作用して生じるアデニル酸シクラーゼの活性抑制も起こるため、結果として、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独投与した場合に比べて、cAMPの生成量が減少する。従って、体重を増加する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、このスクリーニング系でSALPRを介する天然のリガンドに代わり、被験物質を単独で接触させてcAMPの生成量を減少させる(すなわち天然リガンドと同様の作用を有する)化合物を選択すると良い。
- [0099] 体重を減少する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、アデニル酸シクラーゼ活性化剤、SALPRの天然リガンド、および被験物質をスクリーニング用細胞に添加するとよい。アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独で添加した場合に比べて、天然リガンドの作用でcAMPの生成量が減少するが、被験物質が天然リガンドの作用に拮抗する場合には、cAMP生成量の減少を抑制する。このときには、前記被験物質は体重減少作用を有する化合物として選択できる。
- [0100] 細胞内cAMP量を測定する方法としては、例えばイムノアッセイ等があるが、例えば市販のcAMP定量キットを使用することもできる。
- [0101] 別の態様のスクリーニング方法においては、例えばSALPRを細胞膜上に発現(好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入し過剰に発現)し、しかも、cAMP応答配列(CRE)が5'上流に位置するレポーター遺伝子(例えばアルカリフォスファターゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、ベータラクタマーゼ遺伝子、ニトロレダクターゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、ベータガラクトシダーゼ遺伝子等、またはGFP(Green Fluorescent Protein)等の蛍光タンパク質遺伝子等)を含有する細胞(以下、「スクリーニング用細胞」と称することもある)を用いることにより、SALPRを介する体重を増加または減少する能力を区別して化合物をスクリーニングすることができる。この態様は、前述のcAMPの生成が減少するとその結果、前記スクリーニング用細胞に導入されているCREをプロモーター領域に有するレ

ポーター遺伝子の転写が抑制されることを利用している。

[0102] 以下、前記態様による、SALPRを介する体重を増加または減少する能力を区別して化合物をスクリーニングする手順について、より具体的に説明する。

すなわち、前記スクリーニング用細胞に導入されているCREは、細胞内のcAMPの濃度が上昇すると発現が亢進する遺伝子群(cAMP誘導性遺伝子)の転写調節領域に共通して存在する塩基配列である。従って、アデニル酸シクラーゼの活性化剤(例えばFSK)をスクリーニング用細胞に添加すると、細胞内のcAMPの濃度が上昇し、その結果、CREの下流に位置するレポーター遺伝子の発現量が増加する。レポーター遺伝子産物の発現量は、レポーター遺伝子産物と反応し基質から生成した発光物質の量に由来する発光を測定することによりもしくはレポーター遺伝子として産生された蛍光タンパク質由来の蛍光を測定することで容易に測定することが可能である。

[0103] また、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を添加する際に、SALPRの天然リガンドを加えると、アデニル酸シクラーゼ活性化剤に起因する前記のアデニル酸シクラーゼ活性促進に加え、前記天然リガンドが本発明によるSALPRに作用して生じるアデニル酸シクラーゼの活性抑制も起こるため、結果として、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独投与した場合に比べて、レポーター遺伝子産物の発現量が低下する。従って、体重を増加する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、このスクリーニング系で、SALPRを介する天然のリガンドに代わり被験物質を単独で接触させてレポーター遺伝子産物の発現量を減少させる(すなわち天然リガンドと同様の作用を有する)化合物を選択すると良い。

[0104] 体重を減少する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、アデニル酸シクラーゼ活性化剤、SALPRの天然リガンド、および被験物質をスクリーニング用細胞に添加するとよい。アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独で添加した場合に比べて、天然リガンドの作用でレポーター遺伝子産物の発現量は減少するが、被験物質が天然リガンドの作用に拮抗する場合には、レポーター遺伝子産物の発現減少を抑制する。このときには、前記被験物質は体重減少作用を有する化合物として選択できる。

。

- [0105] 被験物質による作用が、SALPRに対する結合を介した作用であるか否かは、簡単に確認することができる。例えばスクリーニング用細胞(すなわち、SALPRを細胞膜上に発現し、しかも、CREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含有する細胞)を用いた前記試験と並行して、コントロール用細胞(例えばCREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含有するものの、SALPRを細胞膜上に発現していない細胞)を用いて同様の試験を実施する。その結果、前記被験物質による作用が、SALPRに対する結合による作用でない場合には、スクリーニング用細胞およびコントロール用細胞でレポーター遺伝子産物の発現量に関して同じ現象が観察されるのに対して、前記被験物質による作用が、SALPRに対する結合による作用である場合には、スクリーニング用細胞とコントロール用細胞とでレポーター遺伝子産物の発現量に関して異なる現象が観察される。
- [0106] また、別の態様として、上記のスクリーニング方法により選択された被験物質をヒモまたはヒト以外の生物[例えば非ヒト哺乳動物(例えばウシ、サル、トリ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど)、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など]に投与し、投与後の摂食量、体重、肥満の指標(例えば体脂肪率、BMI(体格指数)、肥満度、体型、身体年齢、インピーダンス、体脂肪量、除脂肪量、体水分量、蛋白質量、筋肉量、無機質量、細胞量、部位別筋肉量、部位別水分量、BMR(基礎代謝量)、エネルギー所要量、腹部肥満率(VSR)、内臓脂肪量、皮下脂肪量、内臓脂肪量レベル、臓器重量、血中パラメーターの変動、血中のレプチン、糖および脂質の量、またはホルモンや分泌ペプチドの量等)を測定することにより体重調節に影響を与える被験物質を確認および決定することができる。上記哺乳動物としては、正常の動物に限らず、遺伝性の病態モデル動物(例えば肥満病モデルであるob/obマウス、db/dbマウス、Zucker fattyラットなど)や遺伝子改変動物でもよい。被験物質の投与形態としては経口的または非経口的に投与する。非経口的な投与経路の様態としては、例えば静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、気道内、直腸内、脳内、好ましくは視床下部近傍の脳室内投与が挙げられる。スクリーニングのための指標としては、体重の測定が挙げられ、さらに摂食量及び肥満の指標を測定することも有効である。また、投与の際に絶食もしくは飽食、さらに脂質過剰食等の条件を課すこともできる。

被験物質の投与回数は1日あたり一回でも数回に分けても良く、被験物質を投与する期間や観察する期間は1日から数週間にわたってもよい。

[0107] リラキシン-3受容体を用いた肥満調節に係る化合物のスクリーニング方法

本発明に使用するリラキシン-3に対する受容体としては、種々の受容体のうち、本発明に使用するリラキシン-3と結合活性を有し、リラキシン-3受容体発現細胞の細胞刺激活性(例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍pH変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosおよびc-junの誘導活性、アラキドン酸遊離など)を有するものを使用することができる。

[0108] 具体的には、リラキシン-3受容体として、報告されている公知の受容体、例えばLGR7(GenBankアクセッション番号NM__021634)、SALPR(GenBankアクセッション番号NM__016568)(GPCR135とも称されている。)またはGPR100(GenBankアクセッション番号AB__083593)(hGPCR11、GPCR142とも称されている。)などを使用することが可能である。また、これら受容体の部分ポリペプチドとして後述のスクリーニング方法に使用可能であれば特に限定されず、例えばリラキシン-3に対する結合能を有する部分ポリペプチド、細胞膜外領域に相当するアミノ酸配列を含む部分ポリペプチドなども使用することもできる。

[0109] 以下、本明細書においては、本発明の好ましい一例として、SALPRを使用するスクリーニング方法について本発明の内容を詳述する。すなわち、本発明は、SALPRまたはその部分ポリペプチドに結合し、肥満調節(肥満を促進または抑制する)に係る化合物のスクリーニング方法を提供するものである。また、SALPRまたはその部分ポリペプチドに被験物質を作用させ、細胞刺激活性を測定することにより、該被験物質に肥満を促進または抑制する作用を有するか否かを決定することができる。

[0110] ここで、本発明に使用するSALPRまたはその部分ポリペプチドは、種々の公知の方法により得ることができ、例えばSALPRをコードするポリヌクレオチド(GenBankアクセッション番号NM__016568)を用いて公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。また別の態様として、公知のポリペプチドの合成法により得ることができ、例えば液相法、固相法など常法に従い合成することが可能であり、通常、自動合成

機を利用することができる。さらに、別の態様によれば、SALPRの部分ポリペプチドは、SALPRを適当なタンパク質分解酵素で切断することによって調製することができる。

- [0111] 本発明に使用するSALPRをコードするポリペプチドは、配列番号4で表されるアミノ酸を含むポリペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸を含むポリペプチドと機能的に等価な改変ポリペプチド、または配列番号4で表されるアミノ酸配列に関して、70%以上の相同性、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、そして最も好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアミノ酸配列であって、しかもSALPRと実質的に同じ活性(例えばリラキシニン-3との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性、または肥満調節作用)を有するポリペプチドを意味する。
- [0112] ここで、配列番号4で表されるアミノ酸を含むポリペプチドと機能的に等価な改変ポリペプチドとは、そのアミノ酸配列が、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドにおいて1または複数個(好ましくは1または数個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列であって、しかもSALPRと実質的に同じ活性(例えばリラキシニン-3との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性、または肥満調節作用)を有するポリペプチドを意味する。
- [0113] さらに、SALPRの部分ポリペプチドも、SALPRと実質的に同じ活性(例えばリラキシニン-3との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性、または肥満調節作用)を有する限り、使用することができる。
- [0114] 以下、遺伝子工学的手法について、より具体的にはSALPRを使用する場合について詳述するが、その部分ポリペプチドについても後述のスクリーニング方法に使用可能であれば特に限定されない。
- [0115] SALPRをコードするポリヌクレオチドを適当な宿主細胞に導入し、得られた形質転換体から発現可能な条件下で培養し、発現タンパク質の分離および精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から所望のポリペプチドを分離および精製することにより調製することができる。前記の分離および精製方法としては、例えば硫酸塩析、イオン交換セルロースを用いるイオン交換カラムクロマトグラフィー、分子篩ゲル

を用いる分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテインA結合多糖類を用いる親和性カラムクロマトグラフィー、透析、または凍結乾燥等を挙げることができる。

[0116] 本発明に使用するSALPRをコードするポリヌクレオチドは、本発明に使用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである限り、特に限定されるものではない。

なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNAおよびRNAの両方が含まれる。本発明に使用するポリヌクレオチドには、具体的には下記の(a)〜(e)からなる群より選択されるものが挙げられる。

(a) 配列番号3で表される塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；

(b) 「配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；

(c) 「配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 「配列番号4で表されるアミノ酸配列の1または複数個（好ましくは1または数個）の箇所において、1または複数個（好ましくは1または数個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；および

(e) 「配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチドに関する。

[0117] 本発明の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドである。配列番号3で表される前記ポリヌクレオチドは、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるSALPRをコードする。

[0118] 本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号4で表されるアミノ酸配列の1または複数個（好ましくは1または数個）の箇所において、1または複数個（好ましくは1または数個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。ここで、欠失、置換、挿入および／または付加されてもよいアミノ酸の数は、例えば1〜30個、好ましくは1〜20個、

より好ましくは1〜10個、さらに好ましくは1〜5個、特に好ましくは1〜2個である。

- [0119] 本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。さらに、本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記SALPRと実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。
- [0120] 前記形質転換に使用されるプラスミドは、上記のようなSALPRをコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、当該ポリヌクレオチドを挿入することにより得られるプラスミドを挙げることができる。
- [0121] また、前記形質転換体も、上記のようなSALPRをコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば当該ポリヌクレオチドが宿主細胞の染色体に組み込まれた形質転換体であることもできるし、あるいは、当該ポリヌクレオチドを含むプラスミドの形で含有する形質転換体であることもできるし、あるいは、SALPRを発現していない形質転換体であることもできる。当該形質転換体は、例えば前記プラスミドにより、あるいは、前記ポリヌクレオチドそれ自体により、所望の宿主細胞を形質転換することにより得ることができる。
- [0122] 前記宿主細胞としては、例えば通常使用される公知の微生物、例えば大腸菌（例えば*Escherichia coli* JM109株）または酵母（例えば*Saccharomyces cerevisiae* W303株）、あるいは、公知の培養細胞、例えば動物細胞（例えばCHO細胞、HEK-293細胞、またはCOS細胞）または昆虫細胞（例えばBmN4細胞）を挙げることができる。
- [0123] また、公知の前記発現ベクターとしては、例えば大腸菌に対しては、pUC、pTV、pGEX、pKK、またはpTrcHisを；酵母に対しては、pEMBLYまたはpYES2を；CHO細胞、HEK-293細胞およびCOS細胞に対しては、pcDNA3、pMAMneoまたはpBabe Puroを；BmN4細胞に対しては、カイコ核多角体ウイルス（BmNPV）の

ポリヘドリンプロモーターを有するベクター(例えばpBK283)を挙げることができる。

- [0124] SALPRを含有する細胞は、SALPRを細胞膜表面に発現している限り、特に限定されるものではなく、例えば前記形質転換体(すなわち、SALPRをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドで形質転換された細胞)を、SALPRの発現が可能な条件下で培養することにより得ることもできるし、あるいは、適当な細胞に、SALPRをコードするRNAを注入し、SALPRの発現が可能な条件下で培養することにより得ることもできる。
- [0125] また、SALPRを含有する本発明に使用する細胞膜画分は、例えば本発明によるSALPRを発現する細胞を破碎した後、細胞膜が多く含まれる画分を分離することにより得ることができる。細胞の破碎方法としては、例えばホモジナイザー(例えばPotter-Elvehjem型ホモジナイザー)で細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーまたはポリロン(Kinematica社)による破碎、超音波による破碎、あるいは、フレンチプレスなどで加圧しながら細いノズルから細胞を噴出させることによる破碎などを挙げることができる。また、細胞膜の分画方法としては、例えば遠心力による分画法、例えば分画遠心分離法または密度勾配遠心分離法を挙げることができる。
- [0126] SALPRを介する、本発明による肥満を促進または抑制する化合物のスクリーニング方法では、SALPRもしくは前記細胞膜画分(すなわち、SALPRを含有する細胞膜画分)、または前記細胞(すなわち、SALPRを含有する細胞)を用いることができる。
- [0127] また、本発明によるスクリーニング方法においては、被験物質がSALPRに特異的に結合するか否かを調べる方法と、SALPRに被験物質が結合することにより生じる細胞刺激活性(例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍pH変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosおよびc-junの誘導活性、アラキドン酸遊離など)を調べる方法とが挙げられ、それらを利用することができる。
- [0128] 本発明によるスクリーニング方法においては、例えばSALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、被験物質とを接触させ、SALPRもしくは前記細胞膜画分ま

たは前記細胞と、被験物質が結合するか否かを分析することにより、SALPRを介する肥満を促進または抑制する能力を区別せずに化合物をスクリーニングすることができる。

[0129] 具体的には、被験物質非存在下および被験物質存在下の各条件下において、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、標識した天然のリガンド(すなわち、リラキシン-3)とを接触させ、前記条件下におけるSALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞を介する前記天然リガンドの特異的結合量を比較することにより、SALPRを介する肥満を促進または抑制する能力を区別せずに化合物をスクリーニングすることができる。すなわち、前記被験物質が、SALPRを介する肥満を促進または抑制する能力を有する場合には、被験物質非存在下におけるSALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞を介する天然リガンドの特異的結合量に対して、被験物質存在下における前記特異的結合量が低下する。

[0130] 本発明によるスクリーニング方法において、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞を介する前記天然リガンドの特異的結合量を比較する場合には、前記天然リガンドとして、標識した天然リガンドを用いることができる。前記指標としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などを用いることができる。前記酵素としては、例えば β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼなどを用いることができる。蛍光物質としては、例えばフルオレセイン、チオシアネート、BODIPYなどを用いることができる。発光物質としてはルシフェリン、ルシゲニンなどを用いることができる。場合によっては、天然リガンドと標識物質を結合させるためにビオチン-アビジンの系を用いることもできる。

[0131] このように、本発明によるスクリーニング方法において、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞に結合して、これらと天然リガンドとの結合を阻害する化合物を、SALPRを介する肥満を促進または抑制する能力を区別せずにスクリーニングすることができる。

[0132] 本発明によるスクリーニング方法における別の態様では、被験物質非存在下および被験物質存在下の各条件下において、前記細胞と標識化した天然のリガンド(す

なわち、リラキシン-3)とを接触させ、前記各条件下における前記細胞を介する前記天然リガンドの特異的結合量を比較し、さらに、前記条件下における前記天然リガンドの特定の細胞刺激活性を比較することにより、SALPRを介する肥満を促進または抑制する能力を区別して化合物をスクリーニングすることができる。

[0133] 前記態様においては、前記細胞に結合し、前記細胞に含まれる受容体を介して細胞刺激活性を有する被験物質を、SALPRを介する肥満を促進する化合物として選択することができる。

[0134] 一方、前記態様において、前記細胞と天然リガンドとの結合を阻害するものの、細胞刺激活性を有しない被験物質を、SALPRを介する肥満を抑制する化合物として選択することができる。

[0135] 本発明によるスクリーニング方法は、細胞刺激活性として、例えばアデニル酸シクラーゼの活性抑制を利用することによって実施することができる。

[0136] この態様のスクリーニング方法においては、例えばアデニル酸シクラーゼの活性化によって細胞内に生成するcAMPを公知の手法で測定すればよく、SALPRを介する肥満を促進または抑制する能力を区別して化合物をスクリーニングすることができる。この態様は、SALPRに天然リガンドが結合することにより生じる細胞内シグナル伝達、すなわち、SALPRの細胞刺激活性の一つであるアデニル酸シクラーゼの活性抑制を利用するものである。具体的には、SALPRに天然リガンドが結合すると、SALPRに共役しているGタンパク質ファミリーの一つであるGiファミリーが、アデニル酸シクラーゼを抑制し、細胞内に生成されるサイクリックAMP (cAMP:アデニル酸シクラーゼによりATPから生成される) 量を減少させることによる。

[0137] 例えばSALPRを細胞膜上に発現(好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入し過剰に発現)した哺乳動物由来細胞(例えばHEK-293細胞もしくはCHO細胞)にアデニル酸シクラーゼの活性化剤[例えばフォルスコリン(FSK)]を添加すると、細胞内のcAMPの濃度が上昇する。

[0138] また、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を添加する際に、SALPRの天然リガンドを加えると、アデニル酸シクラーゼ活性化剤に起因する前記のアデニル酸シクラーゼ活性促進に加え、前記天然リガンドが本発明によるSALPRに作用して生じるアデニル

酸シクラーゼの活性抑制も起こるため、結果として、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独投与した場合に比べて、cAMPの生成量が減少する。従って、肥満を促進する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、このスクリーニング系でSALPRを介する天然のリガンドに代わり、被験物質を単独で接触させてcAMPの生成量を減少させる(すなわち天然リガンドと同様の作用を有する)化合物を選択すると良い。

[0139] 肥満を抑制する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、アデニル酸シクラーゼ活性化剤、SALPRの天然リガンド、および被験物質をスクリーニング用細胞に添加するとよい。アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独で添加した場合に比べて、天然リガンドの作用でcAMPの生成量が減少するが、被験物質が天然リガンドの作用に拮抗する場合には、cAMP生成量の減少を抑制する。このときには、前記被験物質は肥満抑制作用を有する化合物として選択できる。

[0140] 細胞内cAMP量を測定する方法としては、例えばイムノアッセイ等があるが、例えば市販のcAMP定量キットを使用することもできる。

[0141] 別の態様のスクリーニング方法においては、例えばSALPRを細胞膜上に発現(好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入し過剰に発現)し、しかも、cAMP応答配列(CRE)が5'上流に位置するレポーター遺伝子(例えばアルカリフォスファターゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、ベータラクタマーゼ遺伝子、ニトロレダクターゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、ベータガラクトシダーゼ遺伝子等、またはGFP(Green Fluorescent Protein)等の蛍光タンパク質遺伝子等)を含有する細胞(以下、「スクリーニング用細胞」と称することもある)を用いることにより、SALPRを介する肥満を促進または抑制する能力を区別して化合物をスクリーニングすることができる。この態様は、前述のcAMPの生成が減少するとその結果、前記スクリーニング用細胞に導入されているCREをプロモーター領域に有するレポーター遺伝子の転写が抑制されることを利用している。

[0142] 以下、前記態様による、SALPRを介する肥満を促進または抑制する能力を区別して化合物をスクリーニングする手順について、より具体的に説明する。

すなわち、前記スクリーニング用細胞に導入されているCREは、細胞内のcAMPの濃度が上昇すると発現が亢進する遺伝子群(cAMP誘導性遺伝子)の転写調節

領域に共通して存在する塩基配列である。従って、アデニル酸シクラーゼの活性化剤(例えばFSK)をスクリーニング用細胞に添加すると、細胞内のcAMPの濃度が上昇し、その結果、CREの下流に位置するレポーター遺伝子の発現量が増加する。レポーター遺伝子産物の発現量は、レポーター遺伝子産物と反応し基質から生成した発光物質の量に由来する発光を測定することによりもしくはレポーター遺伝子として産生された蛍光タンパク質由来の蛍光を測定することで容易に測定することが可能である。

- [0143] また、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を添加する際に、SALPRの天然リガンドを加えると、アデニル酸シクラーゼ活性化剤に起因する前記のアデニル酸シクラーゼ活性促進に加え、前記天然リガンドが本発明によるSALPRに作用して生じるアデニル酸シクラーゼの活性抑制も起こるため、結果として、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独投与した場合に比べて、レポーター遺伝子産物の発現量が低下する。従って、肥満を促進する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、このスクリーニング系で、SALPRを介する天然のリガンドに代わり被験物質を単独で接触させてレポーター遺伝子産物の発現量を減少させる(すなわち天然リガンドと同様の作用を有する)化合物を選択すると良い。
- [0144] 肥満を抑制する作用を有する化合物をスクリーニングする場合には、アデニル酸シクラーゼ活性化剤、SALPRの天然リガンド、および被験物質をスクリーニング用細胞に添加するとよい。アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独で添加した場合に比べて、天然リガンドの作用でレポーター遺伝子産物の発現量は減少するが、被験物質が天然リガンドの作用に拮抗する場合には、レポーター遺伝子産物の発現減少を抑制する。このときには、前記被験物質は肥満抑制作用を有する化合物として選択できる。
- [0145] 被験物質による作用が、SALPRに対する結合を介した作用であるか否かは、簡単に確認することができる。例えばスクリーニング用細胞(すなわち、SALPRを細胞膜上に発現し、しかも、CREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含む細胞)を用いた前記試験と並行して、コントロール用細胞(例えばCREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含むものの、SALPRを細胞膜上に発現していない細胞)

を用いて同様の試験を実施する。その結果、前記被験物質による作用が、SALPRに対する結合による作用でない場合には、スクリーニング用細胞およびコントロール用細胞でレポーター遺伝子産物の発現量に関して同じ現象が観察されるのに対して、前記被験物質による作用が、SALPRに対する結合による作用である場合には、スクリーニング用細胞とコントロール用細胞とでレポーター遺伝子産物の発現量に関して異なる現象が観察される。

- [0146] また、別の態様として、上記のスクリーニング方法により選択された被験物質をヒトまたはヒト以外の生物[例えば非ヒト哺乳動物(例えばウシ、サル、トリ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど)、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など]に投与し、投与後の摂食量、体重、肥満の指標(例えば体脂肪率、BMI(体格指数)、肥満度、体型、身体年齢、インピーダンス、体脂肪量、除脂肪量、体水分量、蛋白質量、筋肉量、無機質量、細胞量、部位別筋肉量、部位別水分量、BMR(基礎代謝量)、エネルギー所要量、腹部肥満率(VSR)、内臓脂肪量、皮下脂肪量、内臓脂肪量レベル、臓器重量、血中パラメーターの変動、血中のレプチン、糖および脂質の量、またはホルモンや分泌ペプチドの量等)を測定することにより肥満作用に影響を与える被験物質を確認および決定することができる。上記哺乳動物としては、正常の動物に限らず、遺伝性の病態モデル動物(例えば肥満病モデルであるob/obマウス、db/dbマウス、Zucker fattyラットなど)や遺伝子改変動物でもよい。被験物質の投与形態としては経口的または非経口的に投与する。非経口的な投与経路の様態としては、例えば静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、気道内、直腸内、脳内、好ましくは視床下部近傍の脳室内投与が挙げられる。スクリーニングのための指標としては、肥満の指標を測定することが挙げられ、さらに摂食量及び体重を測定することも有効である。また、投与の際に絶食もしくは飽食、さらに脂質過剰食等の条件を課すこともできる。

被験物質の投与回数は1日あたり一回でも数回に分けても良く、被験物質を投与する期間や観察する期間は1日から数週間にわたってもよい。

- [0147] ここで、本発明に使用する被験物質はどのような化合物であってもよいが、例えば遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、核酸(オリゴDNA

、オリゴRNA)、合成ペプチドライブラリー、抗体、細菌放出物質、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)抽出液、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、海洋生物、植物または動物等由来の抽出物、土壌、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを挙げることができる。

[0148] スクリーニングキット

本発明のスクリーニングキットは、リラキシノー3受容体、好ましくはSALPRもしくは前記細胞膜画分(すなわち、SALPRを含有する細胞膜画分)、または前記細胞(すなわち、SALPRを含有する細胞)を含む。前記スクリーニングキットは、所望により、種々の試薬、例えば標識したリラキシノー3、非標識のリラキシノー3、結合反应用緩衝液、および/または洗浄用緩衝液、説明書、器具をさらに含むことができる。

[0149] 具体的には、前記スクリーニングキットは、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞を含み、所望により、標識した天然リガンド(すなわち、リラキシノー3)、非標識の天然リガンド、および/または結合反应用緩衝液、説明書、器具を含むことができる。

[0150] 本発明の別の態様のスクリーニングキットは、リラキシノー3受容体、好ましくはSALPRを細胞膜上に発現(好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入して過剰に発現)し、しかも、cAMP応答配列(CRE)が5'上流に位置するレポーター遺伝子を含有する細胞を含み、所望により、アルカリフォスファターゼもしくはルシフェラーゼ等の基質、アデニル酸シクラーゼ活性化剤(例えばFSK)、天然リガンド(すなわち、リラキシノー3)、および/または結合反应用緩衝液、説明書、器具を含むことができる。

[0151] 本発明のさらに別の態様のスクリーニングキットは、リラキシノー3受容体、好ましくはSALPRを細胞膜上に発現(好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入して過剰に発現)し、しかも、cAMP応答配列(CRE)が5'上流に位置するレポーター遺伝子を含有する細胞と、CREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含有するものの、SALPRを細胞膜上に発現していない細胞とを含み、所望により、レポーター遺伝子産物の基質、アデニル酸シクラーゼ活性化剤(例えばFSK)、および/または結合反应用緩衝液、説明書、器具を含むことができる。

[0152] 本発明のスクリーニング方法により得られる化合物を含有する医薬

本発明のスクリーニング方法により得られる化合物は、摂食を促進もしくは抑制する化合物、体重を増加もしくは減少させる化合物、または肥満を促進もしくは抑制する化合物である。当該化合物は塩を形成してもよく、薬学的に許容し得る塩が挙げられる。従って、本発明のスクリーニング方法により得られる化合物またはその塩は、摂食（もしくは食欲）調節における何らかの異常に起因する疾患の治療、体重調節における何らかの異常に起因する疾患の治療、肥満調節における何らかの異常に起因する疾患の治療、およびリラキシン-3またはリラキシン-3をコードするポリヌクレオチドの異常に起因する疾患の治療の医薬として用いることができる。また、各種疾患の発症または各種疾患の治療（例えば術中、術後）に伴い増加もしくは減少した摂食（もしくは食欲）および／または体重の回復を目的とする治療の医薬として用いることもできる。前記疾患は、例えば消化管の運動もしくは機能に係る疾患（例えば下痢、便秘、機能性便秘症、過敏性腸症候群、消化管検査時または手術前後における腸管内容物排除のための排便促進など）、免疫機能調節に係る疾患（例えば慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、腎疾患、強皮症、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、多発性硬化症、リウマチ性間質性肺炎、サルコイドーシス、クローン病、炎症性大腸炎、肝硬変、慢性肝炎、劇症肝炎、脳脊髄炎、重症筋無力症など）、エネルギー代謝に係る疾患（例えば糖尿病、肥満性糖尿病、耐糖能障害、ケトosis、アシドーシス、糖尿病性神経障害、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、高脂血症、動脈硬化、狭心症、心筋梗塞、肥満、肥満症、摂食障害、拒食症など）、AIDS、癌、または悪液質などが挙げられる。

本発明によるスクリーニング方法によって、リラキシン-3受容体、好ましくはSALPRまたはその部分ポリペプチドを介した細胞刺激活性、より具体的には、SALPRまたはその部分ポリペプチドに天然リガンドが結合すると引き起こされる細胞刺激活性（例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍pH変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosおよびc-junの誘導活性、アラキドン酸遊離など）の阻害作用（SALPR阻害作用）を有する化合物が提供される。このような化合物を含有する薬剤として、摂食抑制剤、体重減少剤、脂肪量減少剤、肥満

治療剤、糖尿病治療剤などが挙げられる。

[0153] 得られた化合物またはその塩を単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1〜90重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は、ヒトまたはヒト以外の生物[例えば非ヒト哺乳動物(例えばウシ、サル、トリ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど)、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など]に、種々の形態、経口または非経口(例えば静脈注射、筋肉注射、皮下投与、直腸投与、経皮投与)のいずれかの投与経路で投与することができる。従って、本発明のスクリーニング方法により得られる化合物またはその塩を含有する医薬組成物は、投与経路に応じて適当な剤形とされ、具体的には錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口剤、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口剤を挙げることができる。これらの製剤は通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤等を用いて常法により製造することができる。使用可能な無毒性の上記添加剤としては、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、デンプン、ゼラチン、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、またはその塩、エタノール、クエン酸、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0154] それらの投与形態としては、また、必要な投与量範囲は、本発明のスクリーニング方法により得られる化合物またはその塩の選択、投与対象、投与経路、製剤の性質、患者の状態、そして医師の判断に左右される。しかし、適当な投与量は患者の体重1kgあたり例えば約1.0〜1,500 μ g、好ましくは約10〜500 μ g程度を投与するのが好ましい範囲である。投与経路の効率が異なることを考慮すれば、必要とされる投与量は広範に変動することが予測される。例えば経口投与は静脈注射による投与よりも高い投与量を必要とすると予想される。こうした投与量レベルの変動は、当業界でよく理解されているような、標準的経験的な最適化手順を用いて調整することができる。

[0155] リラキシン-3の活性を阻害する物質およびその使用

本発明に使用するリラキシン-3(すなわち、リラキシン-3、改変ポリペプチド、相同

ポリペプチド)の活性を阻害する物質によれば、摂食亢進作用、体重増加作用、肥満作用を抑制または阻害することができる。そこで、リラキシン-3の発現を阻害するものは、リラキシン-3のin vivo、ex vivoおよびin vitroにおける摂食制御および体重制御に伴う機能(例えばエネルギー代謝調節、成長など)、肥満を制限するのに利用できる可能性がある。

- [0156] 本発明に使用するリラキシン-3の活性を阻害する物質には、該活性を有する限り特に制限はないが、例えばリラキシン-3をコードする塩基配列のアンチセンス配列を有するDNAや、リラキシン-3をコードする塩基配列を有する2本鎖RNA(small interfering RNA; siRNA)、リボザイム等リラキシン-3の発現を阻害するもの、あるいはリラキシン-3の抗体や糖タンパク質、さらには上記スクリーニング方法により得られる化合物等のリラキシン-3もしくはリラキシン-3受容体(好ましくは、SALPR)と相互作用してリラキシン-3が有する活性を阻害する物質等が挙げられる。

当該物質は塩を形成してもよく、薬学的に許容し得る塩が挙げられる。従って、リラキシン-3(すなわち、リラキシン-3、改変ポリペプチド、相同ポリペプチド)の活性を阻害する物質またはその塩は、摂食(もしくは食欲)調節における何らかの異常に起因する疾患の治療、体重調節における何らかの異常に起因する疾患の治療、肥満調節における何らかの異常に起因する疾患の治療、およびリラキシン-3またはリラキシン-3をコードするポリヌクレオチドの異常に起因する疾患の治療の医薬として用いることができる。また、疾患の発症または疾患の治療(例えば術中、術後)に伴い増加した摂食(もしくは食欲)および/または体重の減少を目的とする治療の医薬として用いることもできる。前記疾患は、例えば消化管の運動もしくは機能に係る疾患(例えば下痢、便秘、機能性便秘症、過敏性腸症候群、消化管検査時または手術前後における腸管内容物排除のための排便促進など)、免疫機能調節に係る疾患(例えば慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、腎疾患、強皮症、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、多発性硬化症、リウマチ性間質性肺炎、サルコイドーシス、クローン病、炎症性大腸炎、肝硬変、慢性肝炎、劇症肝炎、脳脊髄炎、重症筋無力症など)、またはエネルギー代謝に係る疾患(例えば糖尿病、肥満性糖尿病、耐糖能障害、ケトosis、アシドーシス、糖尿病性神経障害、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、高脂血症、動

脈硬化、狭心症、心筋梗塞、肥満、肥満症、摂食障害など)などが挙げられる。好ましくは、摂食抑制剤、体重減少剤、脂肪量減少剤、肥満治療剤、糖尿病治療剤などとして使用することができる。

[0157] アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する機構としては、(1)3重鎖形成による転写開始阻害、(2)RNAポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、(3)合成中のRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、(4)イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(5)スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(6)mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、(7)キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(8)翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、(9)リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、(10)mRNA翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに(11)核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる(平島および井上『新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp. 319-347 (1993))。

[0158] 本発明に使用するリラキシン-3のアンチセンス核酸は、上述の(1)-(11)のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよい。すなわち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードするDNAは、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンス核酸は、標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸は、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp以上、さらに好ましくは500bp以上であり、通常3000bp以内、好ましくは2000bp以内、より好ましくは1000bp以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、リラキシン-3の配列情報を基に、ホスホロチオネート法(Stein (1988) Nucleic Acids Res. 16: 3209-21

)等により調製することができる。

[0159] リボザイムとは、RNAを構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム(large ribozyme)およびスモールリボザイム(small liboyme)に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に5'-リン酸と3'-ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さらに(1)グアノシンによる5'-スプライス部位でのトランスエステル化反応を行なうグループIイントロンRNA、(2)リアット構造を経る二段階反応により自己スプライシングを行なうグループIIイントロンRNA、および(3)加水分解反応によるtRNA前駆体を5'側で切断するリボヌクレアーゼPのRNA成分に分類される。それに対して、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp程度)であり、RNAを切断して、5'-ヒドロキシル基と2'-3'環状リン酸を生じさせる。スモールリボザイムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225)、ヘアピン型(Buzayan (1986) Nature 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)等のリボザイムが含まれる。リボザイムは、改変および合成が容易なため多様な改良方法が公知であり、例えばリボザイムの基質結合部を標的部位近くのRNA配列と相補的となるように設計することにより、標的RNA中の塩基配列UC、UUまたはUAを認識して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225; 小泉誠および大塚栄子 (1990) 蛋白質核酸酵素35: 2191; Koizumi et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7059)。ヘアピン型のリボザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992) 化学と生物 30: 112)。

[0160] 1998年に、線虫においてRNA同士が邪魔し合い働きを失う現象(RNA干渉)が観察された(Fire et al. (1998) Nature 391: 806-11)。RNA干渉とは、二本鎖の人工RNAを細胞に導入することにより、同じ塩基配列を有するRNAが分解される現象である。その後の研究により、RNA干渉等のRNAサイレンシングの現象は、欠陥を持つmRNAの排除、並びにトランスポゾン、ウイルス等の寄生体に対す

る防御のための細胞機構であることが示唆されている。現在では、多くの遺伝子の発現を抑制するためのツールとして、二本鎖RNA (small interfering RNA; siRNA) が利用されており、病気の原因遺伝子等の発現抑制をsiRNAを用いて行なうことにより病気を治療・予防する方法も検討されている。本発明のsiRNAは、リラキシナー3のmRNAの転写を阻害する限り、特に限定されない。通常、siRNAは、標的mRNAの配列に対するセンス鎖およびアンチセンス鎖の組合せであり、少なくとも10個から標的mRNAと同じ個数までのヌクレオチド長を有する。好ましくは、15〜75個、より好ましくは18〜50個、さらに好ましくは20〜25個のヌクレオチド長である。リラキシナー3の発現を抑制するために、siRNAは公知の方法により細胞に導入することができる。例えばsiRNAを構成する二本のRNA鎖を、一本鎖上にコードするDNAを設計し、該DNAを発現ベクターに組み込み、細胞を該発現ベクターで形質転換し、siRNAをヘアピン構造を有する二本鎖RNAとして細胞内で発現させることができる。トランスフェクションにより持続的にsiRNAを産生するプラスミド発現ベクターも設計されている(例えばRNAi-Ready pSIREN Vector、RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector (BD Biosciences Clontech社))。siRNAの塩基配列は、例えばAmbion website (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) のコンピュータープログラムを用いて設計することができる。機能的siRNAをスクリーニングするためのキット(例えばBD Knockout RNAi System (BD Biosciences Clontech社)) 等も市販されており利用可能である。

[0161] 患者の細胞内における遺伝子の発現を制御するための遺伝子治療において、本発明のアンチセンス核酸、リボザイムおよびsiRNAを、直接組織に投与してもよく、またはこれらを発現するように作成された構築物を有する任意のベクター(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リポソーム等を利用した非ウイルスベクター)を、直接組織に投与してもよい(in vivo法)。これらは、例えば筋肉注射、皮下注射、動脈内注射、静脈内注射等によって、組織部位へ注入することができる。

または、予め体外で、細胞に、本発明のアンチセンス核酸、リボザイムおよびsiRNAを発現するように作成された構築物を有するベクターを導入してもよい。得られた

細胞を、例えば筋肉注射、皮下注射、動脈内注射、静脈内注射等により患者の組織に注入する(ex vivo法)。使用細胞は、患者の細胞と異種または同種であってよいが、好ましくは同種、より好ましくは患者から採取した細胞である。

- [0162] 本発明のアンチセンス核酸、リボザイムおよびsiRNA、またはこれらを発現するように作成された任意のベクターは、単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合されて、医薬品組成物(例えば摂食抑制剤、肥満治療剤、糖尿病治療剤)として使用され得る。例えば、注射剤の形態で投与する場合には、医薬品組成物は、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の糖溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等を含んでもよい。

これらの投与量は、患者の体重、年齢、症状、投与形態等により変動するが、当業者であれば、必要に応じて適当な投与量を選択することができる。

- [0163] 本発明に使用する抗体には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および抗体フラグメントが含まれる。

本発明に使用するモノクローナル抗体は、免疫用抗原およびスクリーニング用抗原として、リラキシニン-3(すなわち、リラキシニン-3、改変ポリペプチド、相同ポリペプチド)またはそれらの部分断片を用いることを除いて、それ自体公知の手段により得ることができる。例えば前記免疫用抗原を用いてマウスを免疫し、そのマウスから取得した脾臓細胞と、マウス骨髓腫細胞とを、細胞融合法(Nature, 256, 495(1975))、または電気細胞融合法(J. Immunol. Method, 100, 181-189(1987))を用いて細胞融合し、前記スクリーニング用抗原を用いてスクリーニングすることにより、本発明に使用するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

- [0164] 前記ハイブリドーマを培養する培地としては、ハイブリドーマの培養に適した培地であればよく、好ましくはダルベッコ氏変法イーグル氏最小必須培地(Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium)にウシ胎児血清、L-グルタミン、L-ペシルビン酸および抗生物質(ペニシリンGおよびストレプトマイシン)を含む培地が用いられる。前記ハイブリドーマの培養は、培地中で行なう場合には、5%CO₂濃度、3

7℃の条件下で約3日間行なうことができる。また、マウスの腹腔内で培養する場合には、約14日間で行なうことができる。

- [0165] このようにして得られた培養液またはマウスの腹水から、タンパク質の分離および精製常法に従って、前記モノクローナル抗体を分離および精製することが可能である。このような方法としては、例えば硫酸塩析、イオン交換セルロースを用いるイオン交換カラムクロマトグラフィー、分子篩ゲルを用いる分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテインA結合多糖類を用いる親和性カラムクロマトグラフィー、透析または凍結乾燥などを挙げることができる。
- [0166] また、本発明に使用するポリクローナル抗体も、免疫用抗原およびスクリーニング用抗原として、リラキシニン-3(すなわち、リラキシニン-3、改変ポリペプチド、相同ポリペプチド)またはそれらの部分断片を用いることを除いて、それ自体公知の方法、例えば以下に示す方法により調製することができる。すなわち、抗原を含む生理食塩水を等量のプロイント氏完全アジュバンドもしくは不完全アジュバンド、またはその等価物、例えばHunter's TiterMax™(フナコシ社)と乳化混合して、哺乳動物(特にウサギまたはヤギなど)の皮下、腹腔内または筋肉内などのいずれかに投与する(初回免疫)。以後、2〜4週間の間隔で同様の操作を行い、数回免疫する。最終免疫から1〜2週間後に哺乳動物の頸動脈または心臓から血液を採取して血清を硫酸アンモニウムによって塩析することにより調製することができる。
- [0167] 本発明に使用する抗体フラグメントは、前記抗体(モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む)の部分断片であって、しかも、元の抗体と同じ反応特異性を有する限り、特に限定されるものではない。本発明による抗体フラグメントとしては、例えばFab、Fab'、F(ab')₂またはFvを挙げることができる。本発明に使用する抗体フラグメントは、例えば前記によって得られることができるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を常法によりタンパク質分解酵素(例えばトリプシンなど)によって消化し、続いて、タンパク質の分離および精製の常法に従って得ることができる。
- [0168] また別の態様によれば、本発明に使用する抗体は、国際公開第01/068862号パンフレット、特開2002-345468号明細書に記載の方法により得ることができる。また、公知となったリラキシニン-3の抗体を使用することができ、例えば特開2002-345

468号明細書の実施例に記載された抗体(モノクローナル抗体:HK4-144-10)を挙げることができる。

[0169] 本発明に使用する抗体は、医薬品組成物として用いることもでき、例えば摂食(もしくは食欲)抑制剤、肥満治療剤、糖尿病治療剤として使用することができる。本発明に使用する抗体は、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることができる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1〜90重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は、ヒトまたはヒト以外の生物[例えば非ヒト哺乳動物(例えばウシ、サル、トリ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど)、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など]に、種々の形態、経口または非経口(例えば静脈注射、筋肉注射、皮下投与、直腸投与、経皮投与)のいずれかの投与経路で投与することができる。従って、本発明の抗体を含有する医薬組成物は、投与経路に応じて適当な剤形とされ、具体的には錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口剤、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口剤を挙げることができる。これらの製剤は通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤等を用いて常法により製造することができる。使用可能な無毒性の上記添加剤としては、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、デンプン、ゼラチン、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、またはその塩、エタノール、クエン酸、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0170] それらの投与形態としては、また、必要な投与量範囲は、抗体の選択、投与対象、投与経路、製剤の性質、患者の状態、そして医師の判断に左右される。しかし、適当な投与量は患者の体重1kgあたり例えば約0.01〜30mg、好ましくは約0.1〜10mg程度を投与するのが好ましい範囲である。投与経路の効率が異なることを考慮すれば、必要とされる投与量は広範囲に変動することが予測される。例えば経口投与は静脈注射による投与よりも高い投与量を必要とすると予想される。こうした投与量レベルの変動は、当業界でよく理解されているような、標準的経験的な最適化手順を用いて調整することができる。

[0171] リラキシン-3もしくはリラキシン-3受容体(好ましくはSALPR)と相互作用し、リラキ

シンー3の活性を阻害する物質は、本発明のスクリーニング法によって得ることができる。前記スクリーニング方法によって得られる化合物の好適例として、後述する実施例に記載された1,2,5-oxadiazolo[3,4-a]1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]1,2,5-oxadiazolo[3,4-i]1,2,5-oxadiazolo[3,4-m][16]annulene(以下、「化合物1」と称する場合もある。)を挙げることができる。当該化合物の投与形態は、前記本発明のスクリーニング方法により得られる化合物を含有する医薬に関する記載を参照すればよい。

[0172] 本明細書において「治療」とは、一般的に、所望の薬理学的効果および/または生理学的効果を得ることを意味する。効果は、疾病および/または症状を完全にまたは部分的に防止する点では予防的であり、疾病および/または疾病に起因する悪影響の部分的または完全な治癒という点では治療的である。本明細書において「治療」とは、哺乳動物、特にヒトの疾病の任意の治療を含み、例えば以下の(a)〜(c)の治療を含む：

- (a) 疾病または症状の素因を持ちうるが、まだ持っているとは診断されていない患者において、疾病または症状が起こることを予防すること；
- (b) 疾病症状を阻害する、即ち、その進行を阻止または遅延すること；
- (c) 疾病症状を緩和すること、即ち、疾病または症状の後退、または症状の進行の逆転を引き起こすこと。

[0173] なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0174] 以下、実施例により本発明についてより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何等限定されるものではない。

[0175] [実施例1] SALPRをコードするポリヌクレオチドの調製

SALPRをコードするポリヌクレオチドの単離は、配列番号3で表される核酸配列を基にして、以下のように行った。配列番号3では1857塩基対が示されており、SALPRをコードする領域は、361番目から1770番目(1410塩基対、470アミノ酸残基)とされている(GenBank アクセッション番号NM_016568)。PCR(polymerase c

hain reaction)により遺伝子を単離するために、配列番号5および配列番号6で表されるPCRプライマーを常法に従い作製した。

[0176] human genomic DNA(Roche Diagnostics社)を鋳型として、配列番号5および配列番号6の組合せからなるPCRプライマーと、Expand High Fidelity PCR System(Roche Diagnostics社)を用い、(98℃ 1分-57℃ 1分-72℃ 3分)を添付の操作方法に従い、30回繰り返すことによりPCRを行った。その結果、約1,400塩基対のDNA断片を得た。

[0177] このDNA断片を、pCR2. 1(Invitrogen社)に挿入し、ABI prism DNA sequencing kit(Perkin-Elmer Applied Biosystems社)により配列を確認した。その結果、配列番号5および6からなるプライマーの組合せによって得られたpCR2. 1-SALPRに挿入された1410塩基対の配列は、配列番号3における361番目から1770番目と長さは同一であったが、配列中には1つの変異が見られた。この変異は、該当部位の核酸配列から翻訳されるアミノ酸には影響を与えないことは明らかであり、SALPRをコードするポリヌクレオチドを得ることができた。

[0178] [実施例2]レトロウイルスベクタープラスミドの調製

pBabe Puro(Morgenstern, J. P. and Land, H. Nucleic Acids Res. vol. 18 3587-3596(1990)) (配列番号7)からSalIおよびClaIで切断することによりSV40 promoter-puro(r)領域を除き、末端をKlenow fragmentにより平滑化した。ここへpIRESHyg(Clontech社)からNsiIおよびXbaIで切断することによりIRES-hyg(r)領域を切り出し、T4ポリメラーゼにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeXIHを得た。

[0179] pBabeXIHからSspIおよびBamHIで切断することにより5'-LTR-packaging signalを除いた。ここへpCLXSN(IMGENEX社)からSspIおよびBamHIで切断することにより切り出した5'-LTR-CMV promoter-packaging signalを挿入しpBabeCLXIHを得た。

[0180] [実施例3]SALPR遺伝子導入用レトロウイルスベクタープラスミドの調製

前記実施例2に記載のレトロウイルス発現用プラスミドpBabeCLXIHを制限酵素HpaIで切断した。ここへ前記実施例1で得たpCR2. 1-SALPRからEcoRVで切断す

ることによりSALPRをコードするポリヌクレオチドを切り出し、T4ポリメラーゼにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeCL (SALPR) IHを得た(図1)。

[0181] [実施例4] SALPR遺伝子導入用レトロウイルスベクターの調製

2×10^6 個の293-EBNA細胞(Invitrogen社)を10cmコーラゲンコートディッシュ(IWAKI社)でDMEM(Sigma社)-10% fetal bovine serum (FCS)-ペニシリン(penicillin) 100units/ml ストレプトマイシン(streptomycin) $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ (PS) (以下、「EBNA培養液」と称する) 10mlを用いて培養した。翌日、pV-gp (pVPack-GP (Stratagene社) からNsiIおよびXbaIで切断することによりIRES-hisDを除きT4ポリメラーゼによる平滑化後、自己環化したもの)、pVPack-VSV-G (Stratagene社)、および実施例3で得たSALPR遺伝子導入用レトロウイルスベクタープラスミド(pBabeCL (SALPR) IH)それぞれ3.3 μg をリポフェクション試薬であるTransIT (Panvera社)を用いて、前記293-EBNA細胞にトランスフェクションした。その6-12時間後にEBNA培養液を交換し、37°Cで培養を続けた。

[0182] トランスフェクション2日後に培養液を回収し、1,200×gで10分間遠心した。

その上清を0.45 μm のフィルター(Millipore社)でろ過したものを非濃縮レトロウイルスベクターとして、さらにウイルスベクターの濃縮を以下に行った。

超遠心用チューブ50 Ultra-Clear Tubes (Beckman社)を70%エタノールで消毒後に蒸留水ですすぎ、ここへ非濃縮ウイルスベクター約35mlを入れた。これを超遠心ローターSW28 (Beckman社)に入れ、超遠心装置XL-90 (Beckman社)を使って19,500rpm 100分間の遠心操作を行った。遠心後、上清を捨てたチューブを氷に入れて放置した。1時間後、チューブ壁面に残った培養液約100 μl 程度の濃縮ウイルスベクター溶液が得られた。

[0183] [実施例5] サイクリックAMP応答配列を含むレポーター系導入細胞SE302の構築

(1) サイクリックAMP応答配列を含むレポーターDNAの作成

公表された論文(Durocher et al. Anal Biochem 2000 284(2):316-26)を参考にcAMPに応じた転写がみられるunitを以下のように構築した。

cAMP responsive element (CRE)を含むunitの作成のために、CREx2hb用として配列番号8および配列番号9、CREx2bp用として配列番号10および配列番

号11で表されるオリゴDNAを常法に従い作成した。

それぞれの組合せからなるオリゴDNAを95℃に熱処理後、徐々に温度を室温まで下げるにより二本鎖DNA (CREx2hb、CREx2bp)を形成させた。CREx2hbをHindIII、BamHI、CREx2bpをBamHI、PstIで消化するとともに、pBluescriptIISK (+) (Stratagene社)をHindIII、PstIで消化した。消化したDNAを電気泳動して両端に制限酵素消化部位をもつDNAを精製した後、これら3つのDNA (CREx2hb、CREx2bp、pBluescriptIISK (+))を一度に連結し (ligation)、得られたプラスミドの配列を解析して、CRE4/pBluescriptIISKを作成した。

- [0184] 次にVIP (vasoactive intestinal peptide) プロモーターを含むDNAを得るために配列番号12および配列番号13で表されるPCRプライマーを常法に従い作成した。

Human genomic DNA (Roche Diagnostics社)を鋳型とし、配列番号12および配列番号13の組合せからなるPCRプライマーと、recombinant Taq polymerase (Takara社)を用いて(94℃ 30秒-55℃ 30秒-72℃ 1分)を35回繰り返すことによりPCRしたところ、264塩基対のDNA (配列番号14)が得られた。この264塩基対のDNAをPstIで消化するとともにCRE4/pBluescriptIISK (+)のPstIサイトに挿入し、得られたプラスミドの配列を確認してCRE4VIP/pBluescriptIISK (+)を作成した(図2A)。得られたCRE4VIP/pBluescriptIISK (+)からHindIIIとSmaIで消化した後、得られたCRE4VIPプロモーター断片の末端平滑化を行なった。

- [0185] 前述の発現用ウイルスベクタープラスミドpBabeCLXよりIRES-hygro(r)領域を除去したpBabeCLXを作成した(図2B)。pBabeCLXよりレトロウイルス本来のエンハンサー活性(LTR)中のNheI-NarI領域を除去することによって得られた外来性プロモーター導入用レトロウイルスベクタープラスミドに、CREとVIPプロモーターを含む配列と、レポーター遺伝子である胎盤由来アルカリフォスファターゼ(PLAP) (Gotoら, Molecular Pharmacology, 49, p. 860-873, 1996)を導入し、pBabeCLcre4vPdNNを得た(図2C)。

- [0186] (2)サイクリックAMP応答配列を含むレポーター系導入細胞SE302の樹立

サイクリックAMP応答配列によりレポーター遺伝子PLAPが誘導されるレトロウイルスベクタープラスミドpBabeCLcre4vPdNNを用い、実施例4に記載の方法に準じてレトロウイルスベクターを調製した。調製したレトロウイルスベクターをHEK293細胞に導入し、限界希釈法により細胞をクローン化して、PLAP誘導の反応性が最も良かったクローン(以下、「SE302細胞」と称する)を以下の実験に供した。

[0187] [実施例6] SALPR遺伝子導入用レトロウイルスベクターによるSALPR発現細胞の調製

前記の実施例4で調製したレトロウイルスベクターによる細胞へのSALPR遺伝子導入を以下のように行った。

前記実施例5で構築した 3×10^3 個のSE302細胞を96well plate(旭テクノガラス社)にDMEM(SIGMA社)–10% fetal bovine serum (FCS)–PS(以下、「培養液」と称する)100 μ lを用いて培養した。翌日、実施例4で調製したレトロウイルスベクターを適宜希釈し、その100 μ lを培養液で調製したpolybrene(最終濃度8 μ g/ml)(別名 hexadimethrine bromide Sigma社)とともにSE302細胞に加えた。その翌日、培養液を500 μ g/mlのハイグロマイシン(Hygromycin)(Invitrogen社)含有の培養液200 μ lと交換し培養した。この条件で増殖してきたSALPR遺伝子導入SE302細胞(以下、「SALPR–SE302細胞」と称する)を適時継代して実験に供した。

[0188] [実施例7] SALPR–SE302細胞におけるフォルスコリン添加によって増加させた転写活性のリラキシン–3による抑制

前記実施例6で構築したSALPR–SE302細胞を、転写活性測定用培地(DMEM–10%FBS(65℃にて30分非働化)を加えたもの)にて懸濁した後、96 well plate(Beckton Dickison社)に1穴あたり 1×10^4 細胞となるようにまいた。翌日、アッセイ用培地(DMEMに0.1%ウシ血清アルブミンを加えたもの)で希釈した各濃度のリラキシン–3(Relaxin–3)(Phoenix Pharamaceuticals社)またはインスリン(Invitrogen社)を添加し、その後フォルスコリン(Carbio Chem社)を最終濃度1 μ mol/Lとなるように添加した。さらに一日培養後、細胞上清を15 μ l回収して化学発光測定用の96well plate(住友ベークライト社)に移し、アッセイ用緩衝液(280mmol

／L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{--NaHCO}_3$ 、8mmol／L MgSO_4 、pH10)を60 μL 、Lumiphos530 (Lumigen社) 70 μL を添加して、室温にて1時間反応させた後、各wellの化学発光をFusionプレートリーダー (Perkin Elmer社)にて測定し転写活性量とした。フォルスコリン1 μmol ／Lを添加した細胞上清の転写活性を100%とし、フォルスコリンを添加していない細胞の上清の活性を0%として各被験サンプルを加えた細胞上清中の活性を%で表示した(図3)。

- [0189] その結果、フォルスコリンによる転写活性の上昇をリラキシン-3はSALPRの活性化を介して抑制することが分かった。この転写活性の上昇は関連ペプチドであるインスリンでは影響がなかったので、リラキシン-3特異的な反応であることが分かった。すなわちこの実験系を用いることで、リラキシン-3によるSALPRの活性化に影響を与える化合物、物質を判別できることが示された。

[0190] [実施例8] SALPR-SE302細胞を用いたリラキシン-3拮抗物質のスクリーニング

実施例7で示した実験系を用いて、リラキシン-3の作用を拮抗する化合物のスクリーニングを実施し、拮抗作用を持つ化合物を見出した。

SALPR-SE302細胞を、転写活性測定用培地(DMEM-F12-10%FBS(65℃にて30分非働化)を加えたもの)にて懸濁した後、384 well plate(Greiner社)に1穴当たり5000細胞となるようにまいた。翌日、フォルスコリン(Fermentek社)溶液に被験化合物(1,2,5-oxadiazolo[3,4-a]1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]

1,2,5-oxadiazolo[3,4-i]1,2,5-oxadiazolo[3,4-m][16]annulene(化合物1))を溶解し、細胞上清に添加した(最終濃度:フォルスコリン3 μmol ／L、被験化合物20 μg ／mL, DMSO (dimethylsulfoxide)0.5%)。その後、アッセイ用培地(DMEM-F12に0.1%ウシ血清アルブミンを加えたもの)で希釈したリラキシン-3(株式会社ペプチド研究所)を最終濃度3nmol／Lとなるように添加した。さらに一日培養後、細胞上清5 μL を回収して化学発光測定用の384well plate(Corning社)に移し、アッセイ用緩衝液を20 μL 、Lumiphos530を25 μL 添加して、室温にて2時間反応させた後、各wellの化学発光をARVOsx3プレートリーダー (Perkin Elmer社)にて測定し転写活性量とした。SALPRを発現していないSE302細胞についても同様に操作し、被験物質の特異性を確認した。

[0191] その結果、SALPR-SE302細胞におけるフォルスコリンによる転写活性の上昇をリラキシノー-3が抑制し、被験物質である化合物1がリラキシノー-3による転写活性の抑制に拮抗した(図4A)。また、SALPRを発現していないSE302細胞における検討では、化合物1は、転写活性を上昇させることはなかった(図4B)。したがって被験物質による作用が、SALPRのリラキシノー-3による活性化を特異的に抑制する化合物であることが確認できた。

[0192] [実施例9]リラキシノー-3脳室内投与による摂食量亢進作用

(1)実験動物と脳室内投与のための前処置

Wistar雄性ラット(7週齢、日本チャールズリバー社)に実験動物用飼料MF(オリエンタル酵母社)を与えて馴化した。ラット(250〜300g)を麻酔下で、側脳室にカニューレを挿入した。その後一週間以上飼育した後に投与実験を行った。

(2)リラキシノー-3溶液の調製

60 μ gのリラキシノー-3(Phoenix Pharmaceutical社)をDMSOにて溶解した後、最終濃度が200 μ mol/Lとなるように人工的脳脊髄液(artificial cerebrospinal fluid)を添加して調製した。析出した沈殿は遠心操作をして取り除き、上清をリラキシノー-3投与液として用いた。ラットへの投与量(投与液中のリラキシノー-3濃度)は実施例7に示された実験系にて、リラキシノー-3による標準曲線を用いて算出したところ、約50pmol/ラットであった。

(3)リラキシノー-3溶液の脳室内投与

ガイドカニューレを装着したラットを2群に分け(1群6匹)、リラキシノー-3投与液もしくはvehicle(リラキシノー-3を除いた前記(2)と同じ組成の溶液)を5 μ L/2分の速度でインフュージョンポンプを用いてラットに投与した。

(4)摂餌量の測定

投与液の脳室内投与後すぐに、ラットは予め重量を測定した餌を入れてあるケージに入れ自由摂食させた。2時間後に餌の減少量を測定することで摂餌量を算出した。各群の平均摂餌量と標準偏差を図5に示す。その結果、投与後2時間の摂餌量は、リラキシノー-3を約50pmol投与したラットでは対照のvehicle投与のラットに比べて有意に増加していた(t-検定、 $p < 0.01$)。従って、リラキシノー-3は摂食行動を増加さ

せることが分かった。

[0193] [実施例10]リラキシニン-3の単回脳室内投与時の血中レプチン濃度上昇

血中レプチン濃度の測定

摂餌量測定後(投与後約3時間後)に前記ラットをネンブタールにて麻酔し、その腹部大動脈より血液を採取した。採取した血液を1,750×gで15分間遠心し、その上清を-80℃にて保存した。後日、上清中のレプチン量をラットレプチン定量ELISAキット(アマシャムバイオサイエンス社)により定量した。

その結果、単回のリラキシニン-3投与ラットでは対照のvehicle投与のラットより血中のレプチン濃度が有意に上昇することが明らかとなった(t-検定、 $p<0.05$ 、図6)。

[0194] [実施例11]リラキシニン-3持続投与による体重増加・肥満作用の亢進

(1)リラキシニン-3溶液の調製

リラキシニン-3(ペプチド研究所社)を生理食塩水にて100 $\mu\text{mol/L}$ となるように溶解し、vehicle(生理食塩水)またはリラキシニン-3溶液を浸透圧ポンプ(alzet osmotic pump model1002(DURECT社) 投与量 6 $\mu\text{L/日}$)とチューブ・投与用カニューレに注入しそれらを接続した。

(2)実験動物と脳室内投与のための処置

Wistar雄性ラット(6週齢、日本チャールズリバー社)に実験動物用飼料MF(オリエンタル酵母社)を与え、個別飼育で4日間馴化した。前記ラット(250~270g)を麻酔下で、側脳室にガイドカニューレを挿入し、浸透圧ポンプを皮下に収めた。

(3)体重増加作用および摂餌量の測定

手術日を0日目として自由摂食下で飼育し、毎朝、体重と餌量を測定した。0日目からの体重の増加量を図7に示した。また、摂餌量は、手術前日から手術日までを0日目とし、一日当たりの餌の減少量を摂餌量として示した(図8)。

手術後1日目よりリラキシニン-3投与ラット群では有意な体重の増加が確認された。また、リラキシニン-3投与群の摂餌量も1日目より有意に増加した(t-検定、** $p<0.01$ 、* $p<0.05$)。

(4)脂肪量、血中レプチン量およびインスリン量の定量

実験終了日(14日目)に体重と餌量を測定した後、ラットをネンブタールにて麻酔し

、精巣周囲の脂肪を取り出し両精巣周囲の脂肪重量を合わせて測定した(図9)。さらに、腹部大動脈より血液を採取した。採取した血液を1,750×gで15分間遠心し、その上清を-80℃にて保存した。後日、上清中のレプチン量をラットレプチン測定キット(L)(IBL社)により定量した(図10A)。また上清中のインスリン量を超高感度ラットインスリン測定キット(森永化学研究所社)により定量した(図10B)。

その結果、精巣周囲脂肪量は対照のvehicle投与のラットに比較し、リラキシン-3持続投与群で有意に増加していた。また血中のレプチン濃度とインスリン濃度も、リラキシン-3を持続投与したラットで有意に上昇していることが明らかとなった(t-検定、** p<0.01、* p<0.05)。従って、リラキシン-3投与により脂肪蓄積を伴う肥満作用が亢進するとともに、インスリン量が増加することが明らかとなった。

[0195] [実施例12]リラキシン-3持続投与による体重増加、運動量への作用

(1)リラキシン-3溶液の調製

リラキシン-3(ペプチド研究所社)を生理食塩水にて100 μmol/Lとなるように溶解し、vehicle(生理食塩水)またはリラキシン-3溶液を浸透圧ポンプ(alzet osmotic pump model1002(DURECT社) 投与量 6 μL/日)とチューブ・投与用カニユーレに注入しそれらを接続した。

(2)実験動物と脳室内投与のための処置

Wistar雄性ラット(5週齢、日本チャールズリバー社)に実験動物用飼料MF(オリエンタル酵母社)を与え、個別飼育で5日間馴化した。前記ラット(170-200g)を麻酔下で、側脳室にガイドカニユーレを挿入し、浸透圧ポンプを皮下に収めた。手術日を0日として運動量の測定日以外は自由摂食・飲水下で飼育し、毎朝体重を測定した(図11)。

前記実施例11と同様に、投与後1日後からリラキシン-3投与ラット群では有意な体重の増加が確認された(t-検定、** p<0.01、* p<0.05)。

(3)自発運動量の測定

前記(2)にて、リラキシン-3投与ラットの体重増加作用に有意な差が認められた日の明期および暗期の自発運動量を、Versamax(Accuscan社)を用いて測定した。明期(投与開始後2、7日後)、暗期(投与開始後3、8日後)のラットを実験開始の1時

間以上前に個別飼育台から実験室へ移動して馴化した後、Versamaxケージ内にラットを入れ直後から90分間の行動量を記録した。90分間の全活動量を図12に示した。

いずれの日においても各群のラットで運動量には有意な変化は認められなかった。すなわち、リラキシン-3による体重増加作用は自発運動量の変化が作用しているのではないことが明らかとなった。

産業上の利用可能性

- [0196] 本発明により、有用な摂食亢進作用、体重増加作用および肥満作用を有するポリペプチド、該ポリペプチドを含有する疾患治療剤、該ポリペプチドの受容体の賦活化、抑制化をする化合物、物質もしくはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、あるいは該ポリペプチドの発現を阻害する物質などを含有してなる摂食抑制剤、肥満治療剤または糖尿病治療剤などが提供される。

請求の範囲

- [1] 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる摂食亢進剤。
- [2] 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる体重増加剤。
- [3] 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる脂肪量増加剤。
- [4] 次の工程;被験物質を、
(A)リラキシノー3受容体、リラキシノー3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、
(B)リラキシノー3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする摂食を亢進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- [5] 次の工程;
配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、
(A)リラキシノー3受容体、リラキシノー3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、
を含むことを特徴とする摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- [6] 次の工程;

- (B) リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする請求項5に記載の摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- [7] リラキシニン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする請求項4-6のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。
- [8] SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする請求項7に記載のスクリーニング方法。
- [9] 次の工程;被験物質を、
(A) リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、
(B) リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする摂食を亢進する化合物またはその塩のスクリーニングキット。
- [10] 次の工程;
配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、
(A) リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、
を含むことを特徴とする摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニングキット。
- [11] 次の工程;
(B) リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする請求項10に記載の摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニングキット。
- [12] リラキシニン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする請求項9-11のいずれか一項に記載のスクリーニングキット。
- [13] SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特

徴とする請求項12に記載のスクリーニングキット。

- [14] 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる体重増加を必要とする疾患の治療剤。
- [15] 疾患が拒食症または悪疫質である請求項14に記載の治療剤。
- [16] 次の工程;被験物質を、
(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、
(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする体重増加作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- [17] 次の工程;
配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、
(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、
を含むことを特徴とする体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- [18] 次の工程;
(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする請求項17に記載の体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- [19] リラキシニン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする請求項16〜18のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。
- [20] SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特

徴とする請求項19に記載のスクリーニング方法。

- [21] 次の工程;被験物質を、
(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、
(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする体重増加作用を有する化合物またはその塩のスクリーニングキット。
- [22] 次の工程;
配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、
(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、
を含むことを特徴とする体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニングキット。
- [23] 次の工程;
(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする請求項22に記載の体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニングキット。
- [24] リラキシニン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする請求項21〜23のいずれか一項に記載のスクリーニングキット。
- [25] SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする請求項24に記載のスクリーニングキット。
- [26] 次の工程;被験物質を、
(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、
(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニング方法。

[27] 次の工程；

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、

を含むことを特徴とする肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニング方法。

[28] 次の工程；

(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする請求項27に記載の肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニング方法。

[29] リラキシニン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする請求項26～28のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

[30] SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする請求項29に記載のスクリーニング方法。

[31] 次の工程；被験物質を、

(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面に接触させる工程、

(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニングキット。

[32] 次の工程；

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A)リラキシニン-3受容体、リラキシニン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜面

分に接触させる工程、

を含むことを特徴とする肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニングキット。

[33] 次の工程；

(B)リラキシニン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする請求項32に記載の肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニングキット。

[34] リラキシニン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする請求項31～33のいずれか一項に記載のスクリーニングキット。

[35] SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする請求項34に記載のスクリーニングキット。

[36] SALPR阻害作用を有する化合物を含有する摂食抑制剤。

[37] SALPR阻害作用を有する化合物が、請求項7または8に記載のスクリーニング方法により得られる化合物であることを特徴とする請求項36に記載の剤。

[38] SALPR阻害作用を有する化合物を含有する体重減少剤。

[39] SALPR阻害作用を有する化合物が、請求項19または20に記載のスクリーニング方法により得られる化合物であることを特徴とする請求項38に記載の剤。

[40] SALPR阻害作用を有する化合物を含有する脂肪量減少剤。

[41] SALPR阻害作用を有する化合物が、請求項29または30に記載のスクリーニング方法により得られる化合物であることを特徴とする請求項40に記載の剤。

[42] SALPR阻害作用を有する化合物を含有する肥満治療剤。

[43] SALPR阻害作用を有する化合物が、請求項19、20、29または30のいずれか一項に記載のスクリーニング方法により得られる化合物であることを特徴とする請求項42に記載の剤。

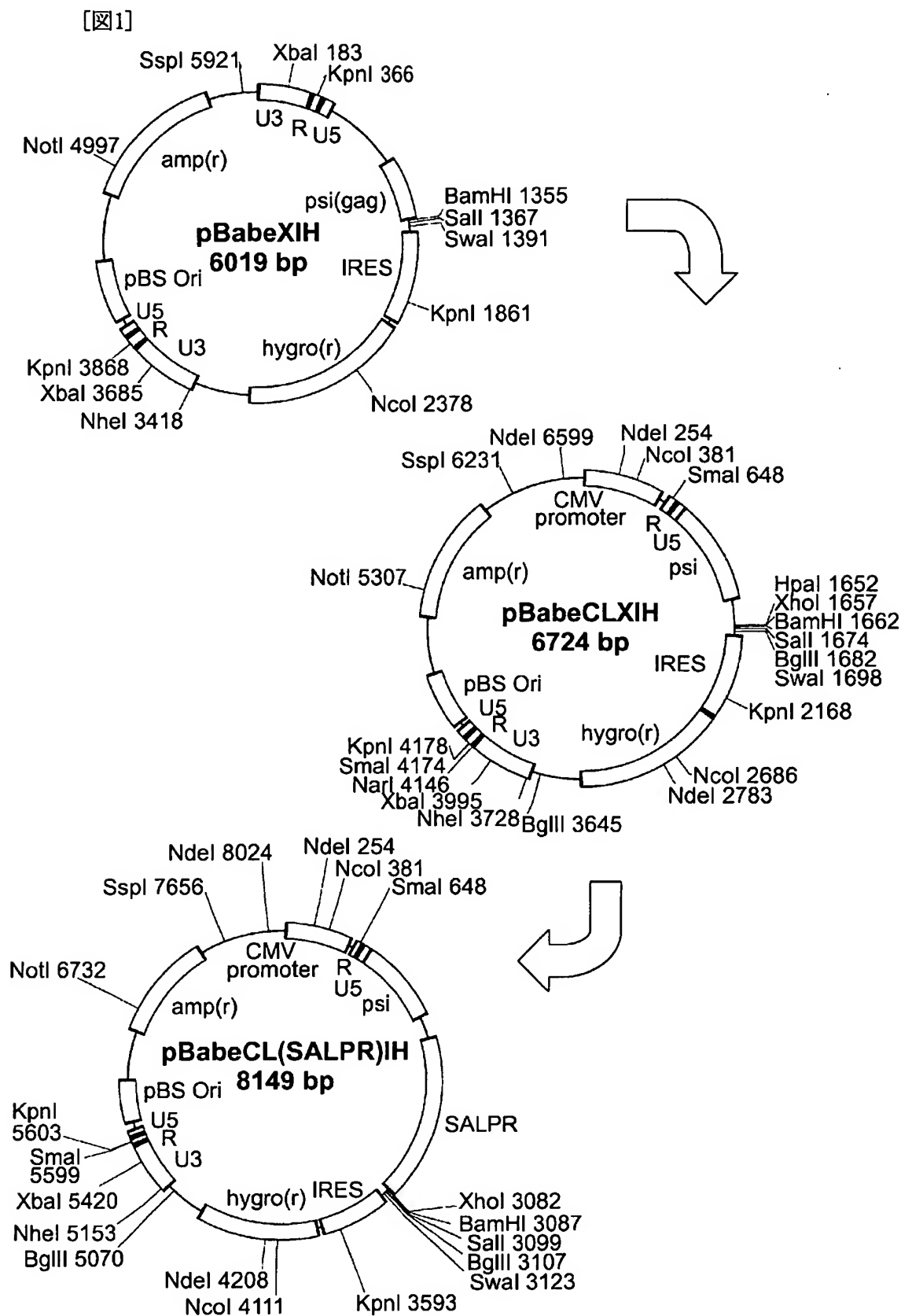
[44] SALPR阻害作用を有する化合物を含有する糖尿病治療剤。

[45] SALPR阻害作用を有する化合物が、請求項19、20、29または30のいずれか一項に記載のスクリーニング方法により得られる化合物であることを特徴とする請求項44に記載の剤。

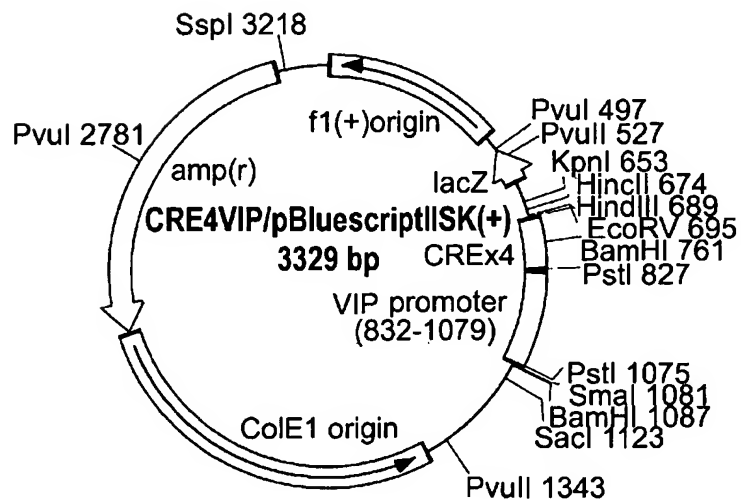
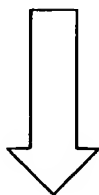
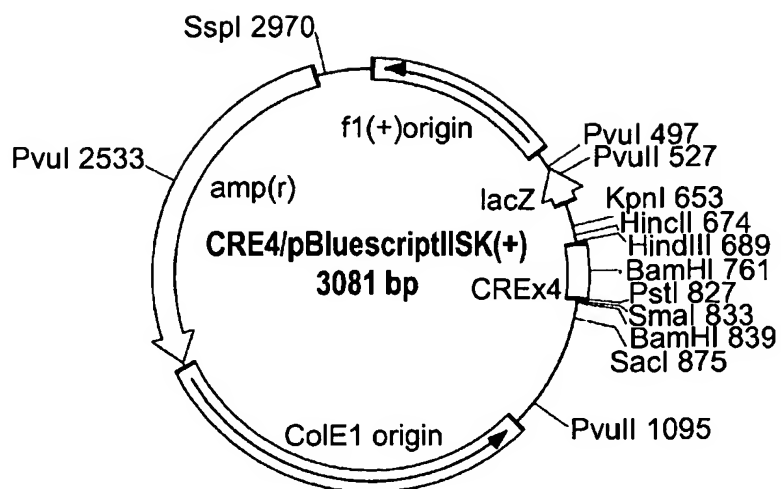
[46] SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特

徴とする請求項36〜45のいずれか一項に記載の剤。

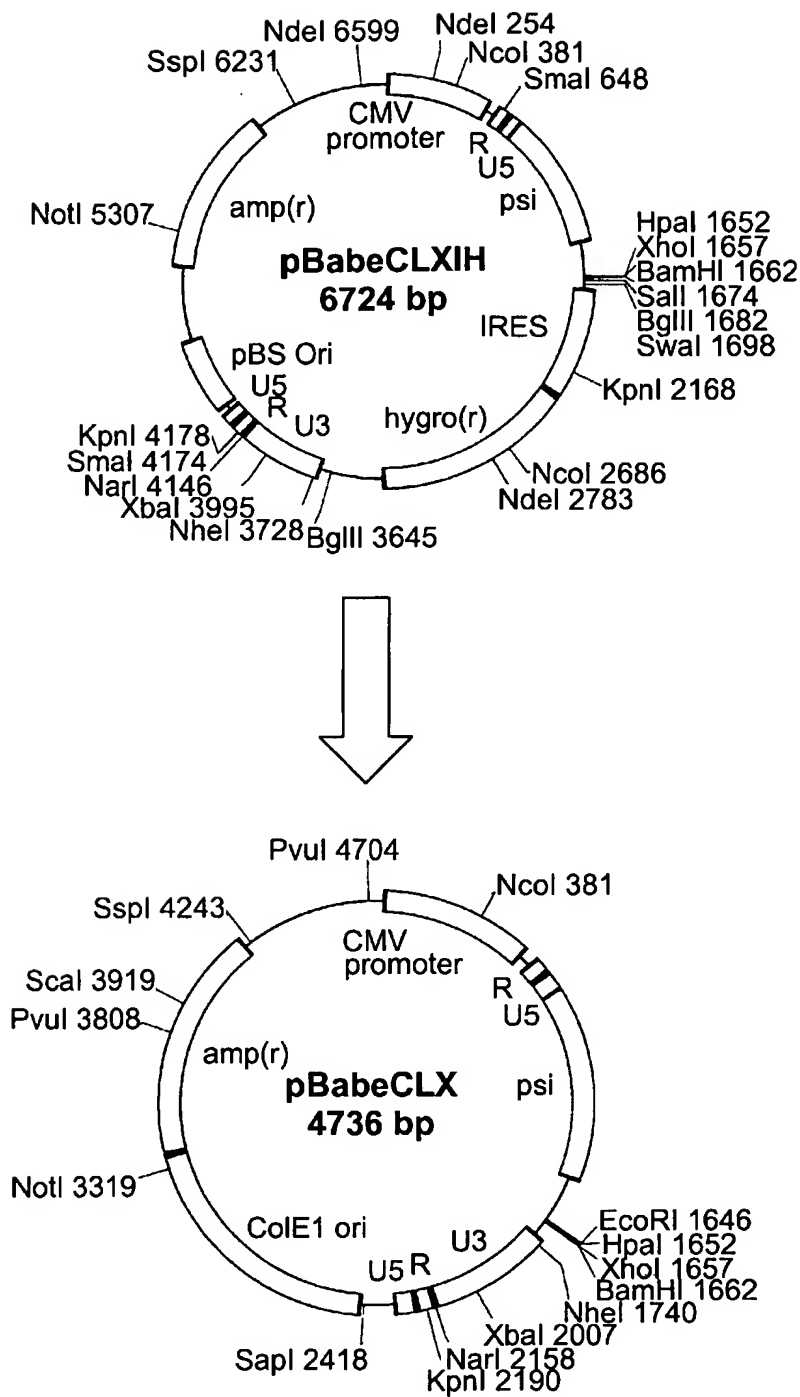
- [47] リラキシン-3受容体に作用する化合物をヒトまたはヒト以外の生物に投与し、投与後の摂食量を測定する工程を含むことを特徴とする、摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- [48] リラキシン-3受容体に作用する化合物が、請求項4〜8のいずれか一項に記載の方法により得られる化合物である、請求項47に記載の方法。
- [49] リラキシン-3受容体に作用する化合物をヒトまたはヒト以外の生物に投与し、投与後の体重を測定する工程を含むことを特徴とする、体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- [50] リラキシン-3受容体に作用する化合物が、請求項16〜20のいずれか一項に記載の方法により得られる化合物である、請求項49に記載の方法。
- [51] リラキシン-3受容体に作用する化合物をヒトまたはヒト以外の生物に投与し、投与後の肥満の指標を測定する工程を含むことを特徴とする、肥満調節に係る化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- [52] リラキシン-3受容体に作用する化合物が、請求項26〜30のいずれか一項に記載の方法により得られる化合物である、請求項51に記載の方法。



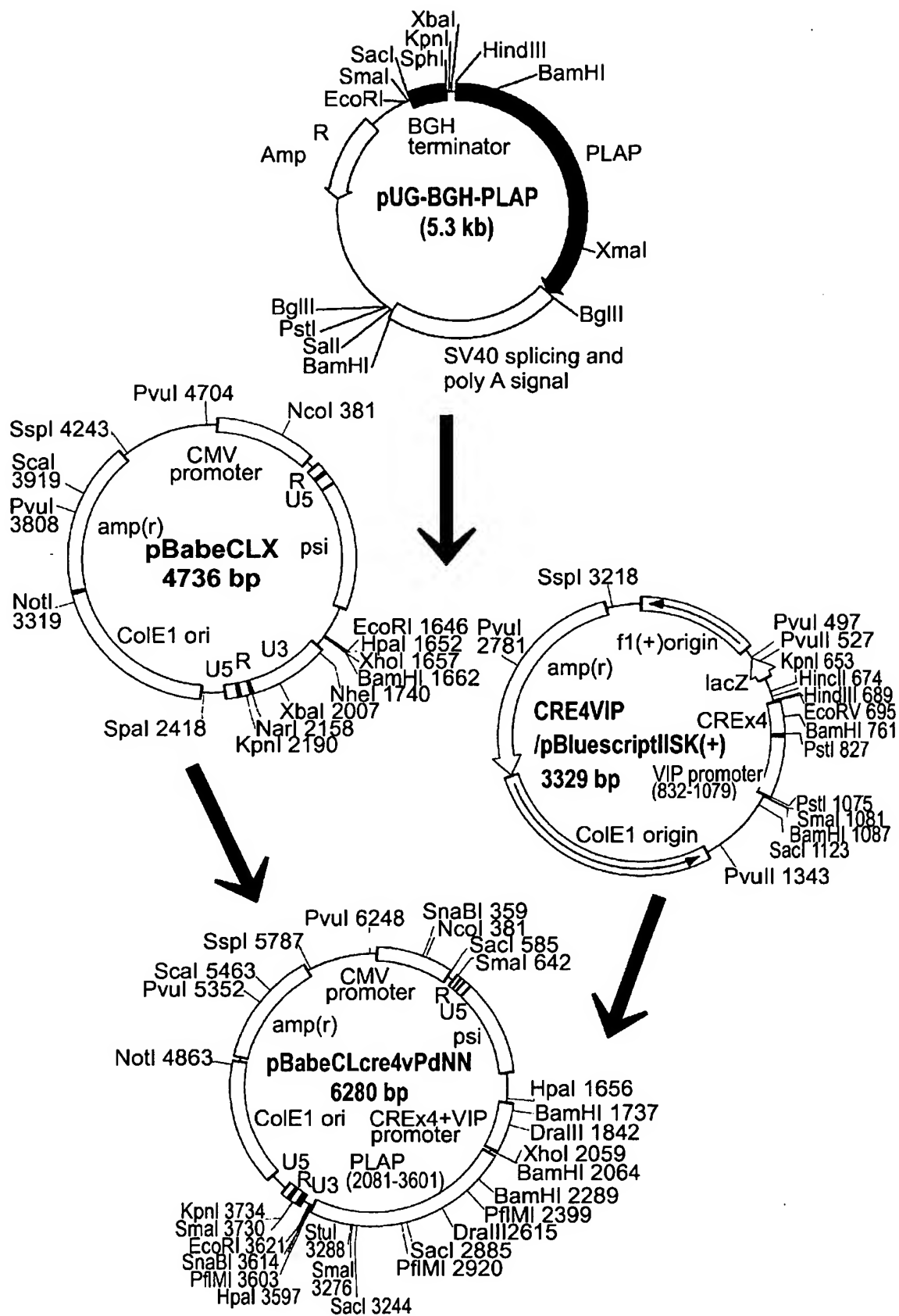
[図2A]



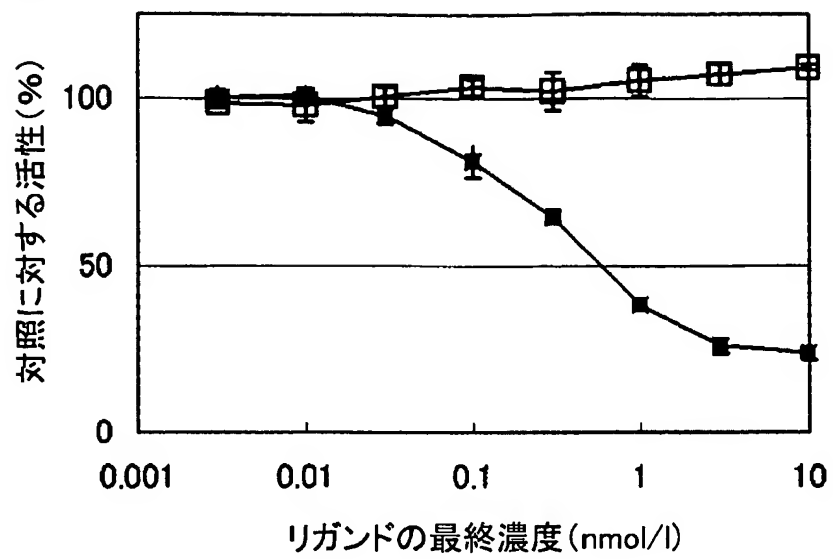
[図2B]



[図2C]

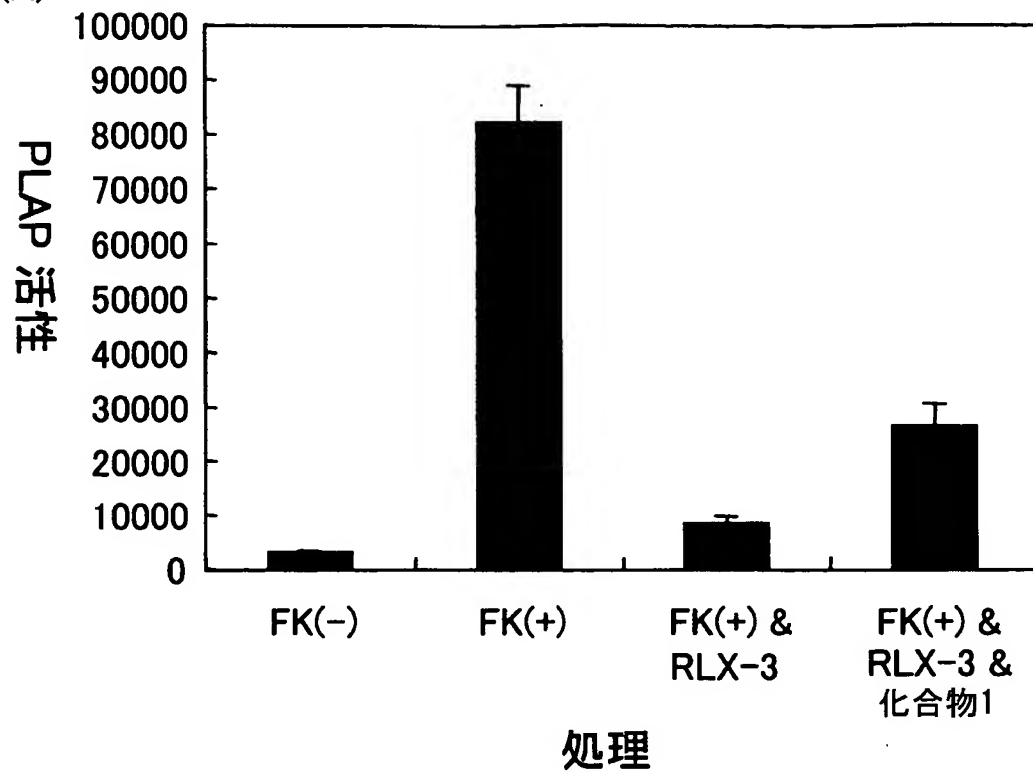


[図3]

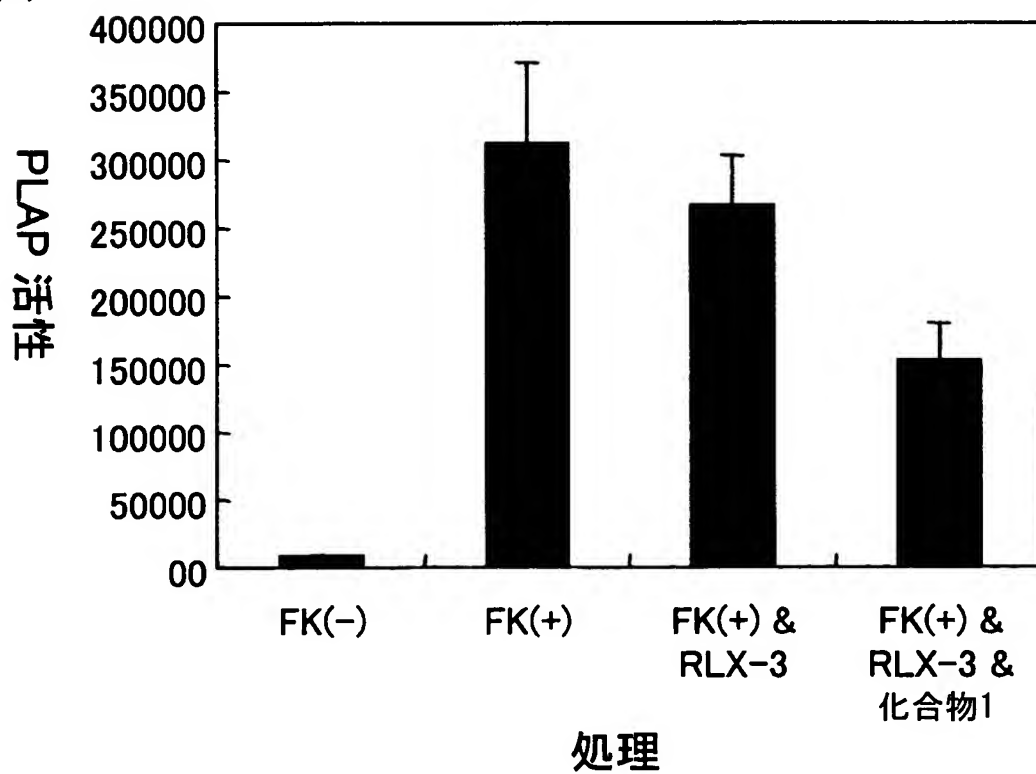


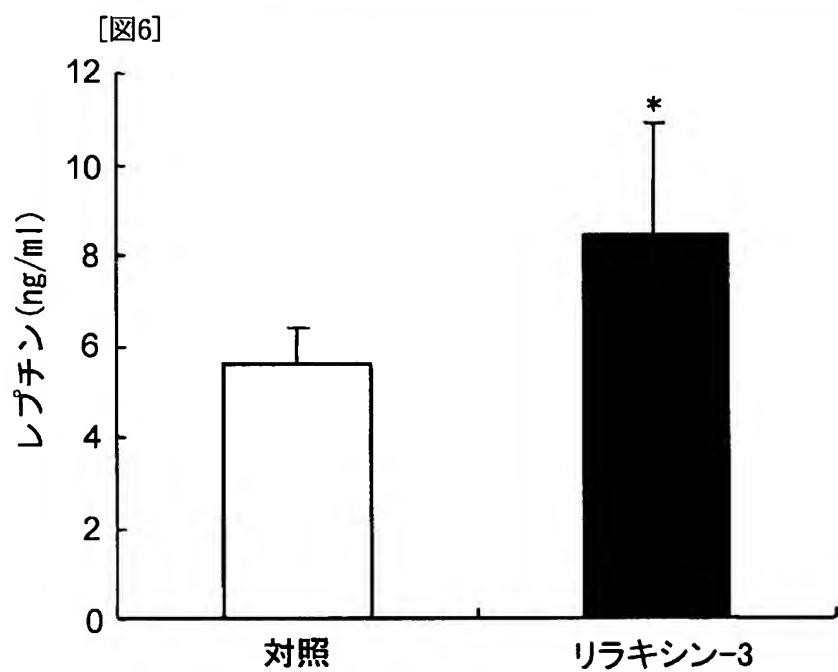
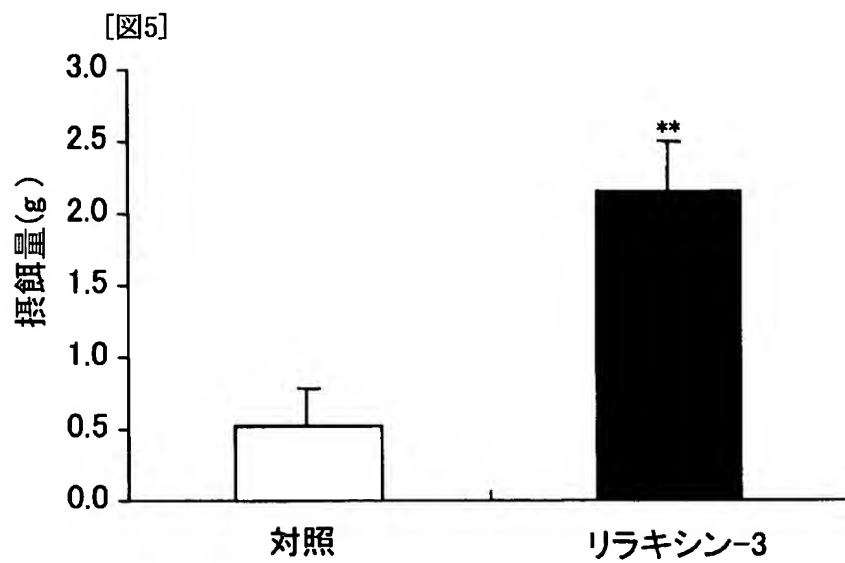
[図4]

(A)

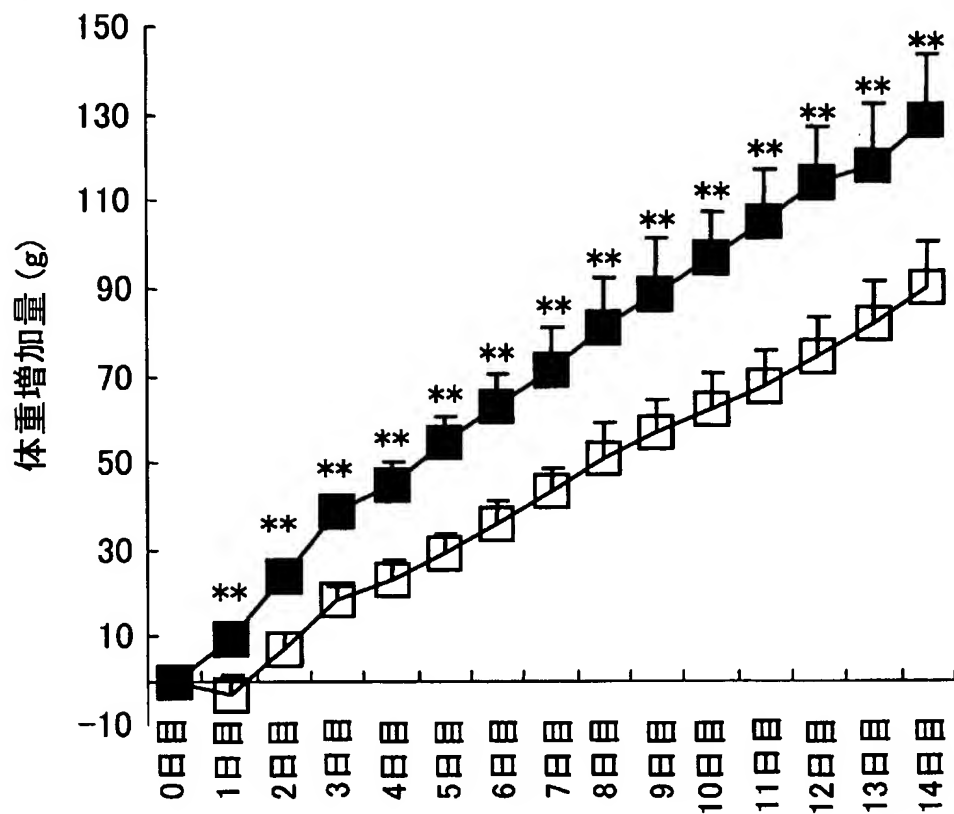


(B)

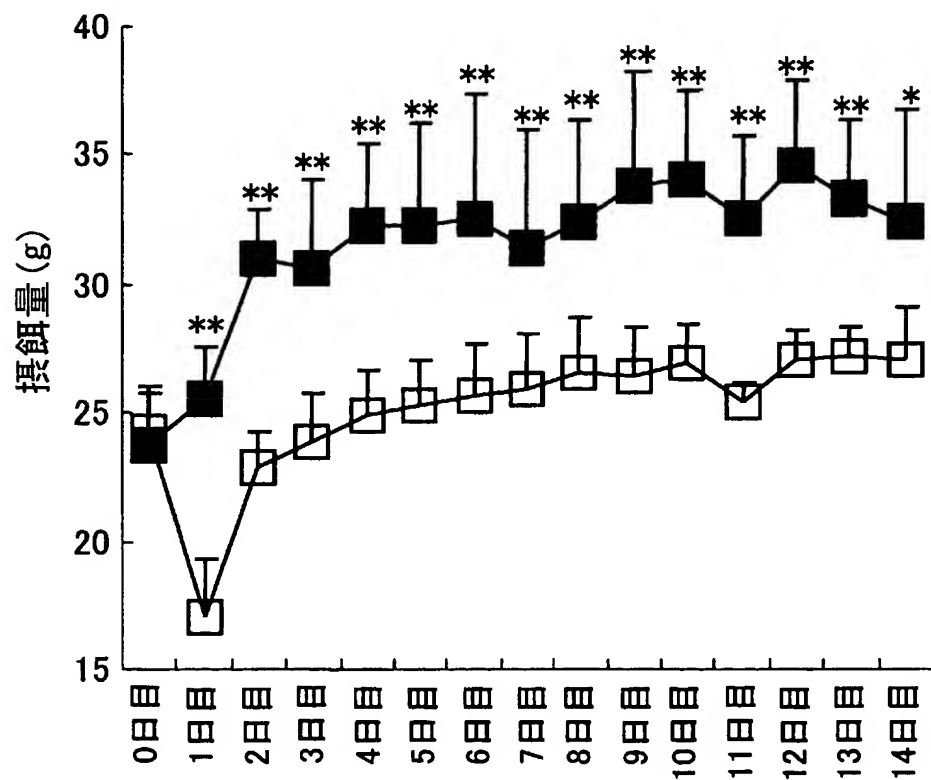




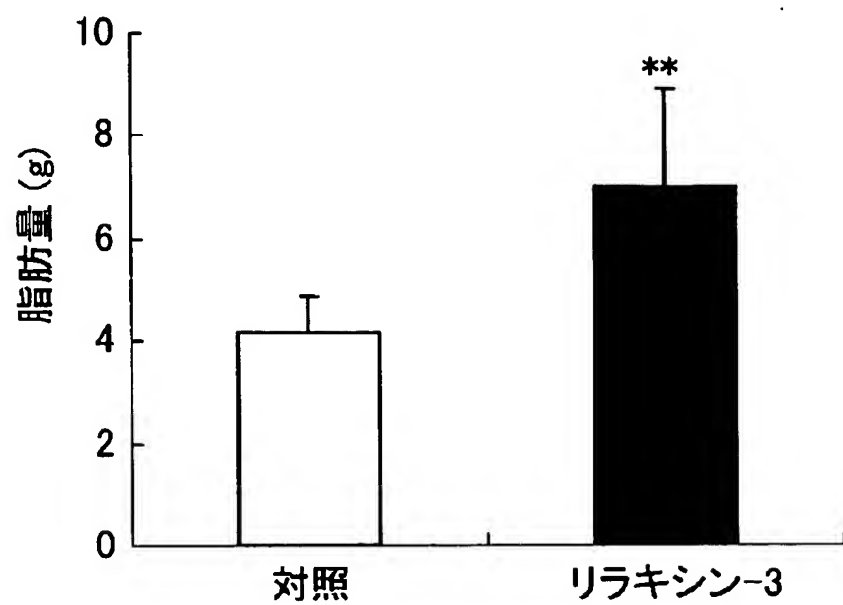
[図7]



[図8]

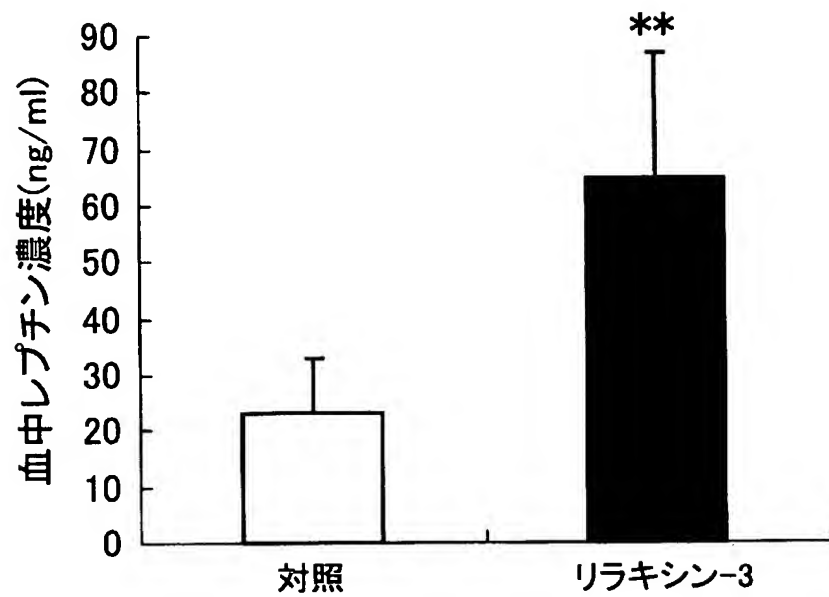


[図9]

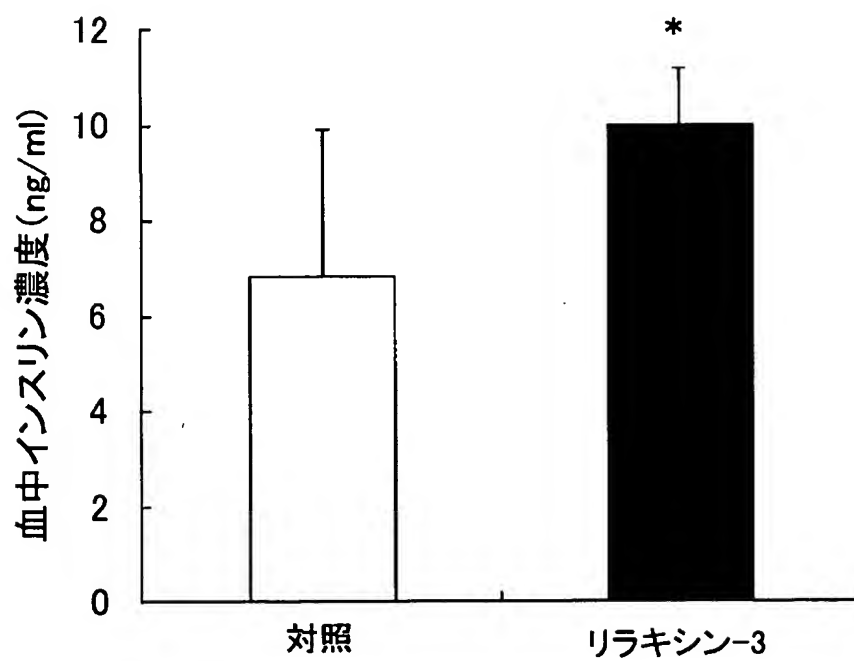


[図10]

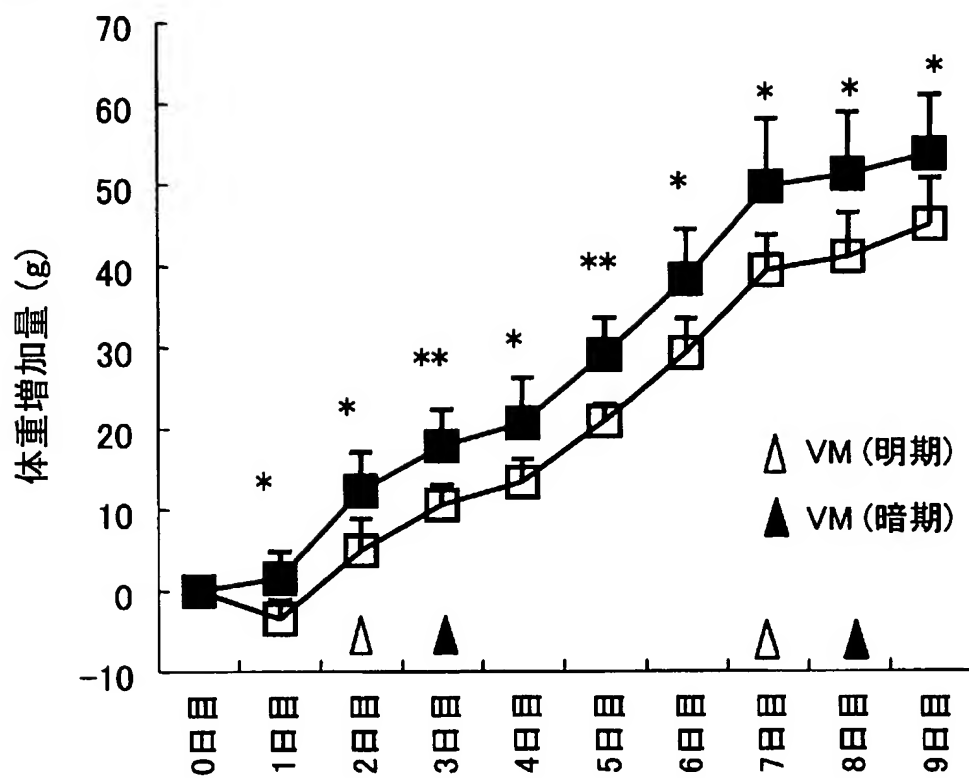
(A)



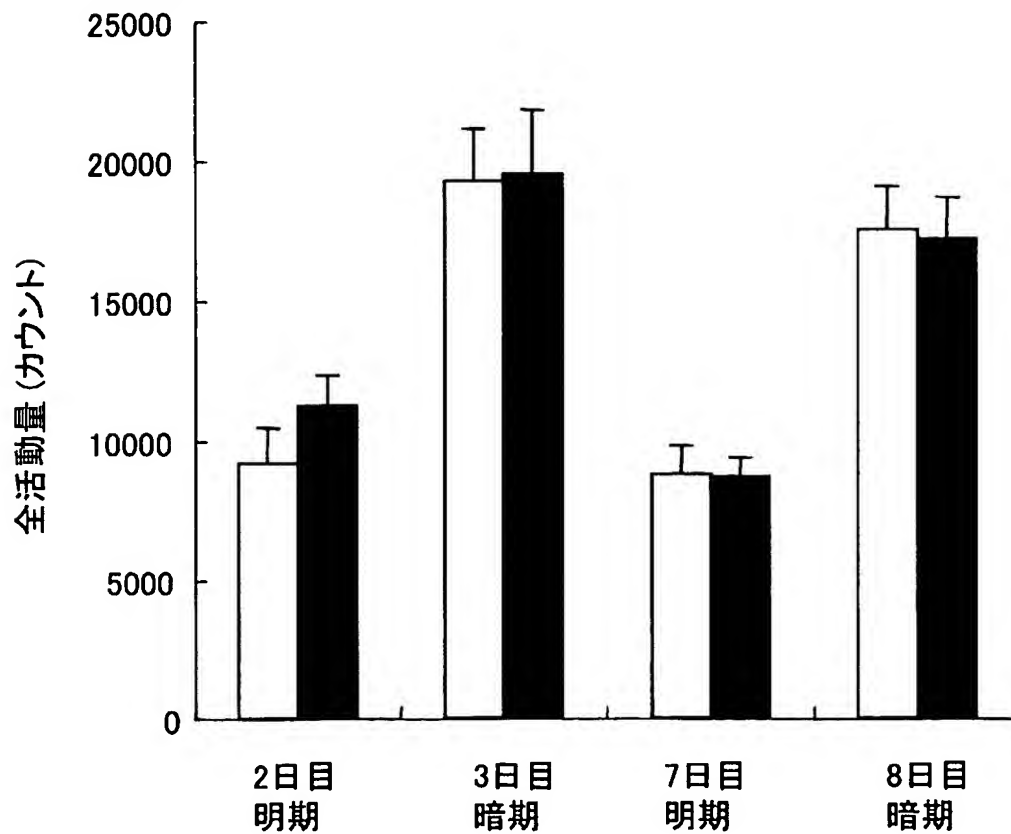
(B)



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001887

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/02, C07K14/435, 14/705, A61K38/00, A61P1/00, 3/04, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-90, C12Q1/00-70, C07K14/00-16/46, A61K38/00, A61P1/00, 3/04, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	C. Liu et al., Identification of relaxin-3/ INSL7 as an endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPCR135, 2003, J.Biol.Chem., 278(50), p.50754-64	1-52
A	C. Liu et al., Identification of relaxin-3/ INSL7 as a ligand for GPCR142, 2003, J.Biol. Chem., 278(50), p.50765-70	1-52
A	R.A. Bathgate et al., Relaxin: new peptides, receptors and novel actions, 2003, Trends Endocrinol Metab, 14(5), p.207-13	1-52
A	H. KIZAWA et al., Production of recombinant human relaxin 3 in AtT20 cells, 2003, Regul. Pept., 113(1-3), pages 79 to 84	1-52



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

*

Special categories of cited documents:

"A"

document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"

earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L"

document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O"

document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P"

document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 March, 2005 (07.03.05)

Date of mailing of the international search report

22 March, 2005 (22.03.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001887

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S. SUDO et al., H3 relaxin is a specific ligand for LGR7 and activates the receptor by interacting with both the ectodomain and the exoloop 2, 2003, J.Biol.Chem., 278(10), p.7855-62	1-52
A	C.S. Samuel et al., Physiological or pathological—a role for relaxin in the cardiovascular system?, 2003, Curr.Opin. Pharmacol., 3(2), p.152-8	1-52
P,A	WO 2004/112575 A2 (TULARIK INC.), 29 December, 2004 (29.12.04), & US 2005/026194 A1	1-52
A	WO 2003/030930 A1 (HOWARD FLOREY INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY AND MEDICINE), 17 April, 2003 (17.04.03), & EP 1434599 A1 & US 2005/026822 A1	1-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001887

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: (See below)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Parts of claims 1 to 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 22, 24, 27, 29, 32, 34, 36 to 45 and 47 to 52 are either not clearly described or not sufficiently supported by the description. Since these claims are not disclosed in the description in a manner sufficiently clear and (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001887

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

complete, no international search was made thereon. Reasons therefor are as follows.

Claims 1 to 3, 5, 10, 14, 17, 22, 27 and 32

Concerning "a functionally equivalent modified peptide" in the above claims, it is stated in the description "a functionally equivalent modified peptide means .. a polypeptide comprising an amino acid sequence having deletion, substitution, insertion and/or addition of one or more amino acids .. and having substantially the same activity .. as relaxin-3" (see [0013]). However, there is a low possibility that, for example, a polypeptide having mutations in a large number of amino acids still sustains an activity equivalent to the original polypeptide. Thus, it is unknown polypeptides having what specific structures correspond to the polypeptide according to these claims and an excessively large amount of trials and errors are needed for a person skilled in the art to obtain such a polypeptide. Thus, it does not appear that the above claims are clearly described. Furthermore, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

Claims 1 to 3, 5, 10, 14, 17, 22, 27 and 32

Concerning "a polypeptide comprising an amino acid sequence with a homology of 70% or above" in the above claims, there is a low possibility that a polypeptide with a homology of about 70% still sustains an activity equivalent to the original polypeptide. Thus, it is unknown polypeptides having what specific structures correspond to the polypeptide according to these claims and an excessively large amount of trials and errors are needed for a person skilled in the art to obtain such a polypeptide. Thus, it does not appear that the above claims are clearly described. Furthermore, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

Claims 7, 12, 19, 24, 29 and 34

It is unknown what part corresponds to "a part" in the above claims. Thus, it does not appear that the above claims are clearly described. Moreover, the inventions according to the above claims involve partial polypeptides not capable of binding to relaxin-3 and thus it is unknown how such an invention can be embodied. Accordingly, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

(continued to next sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001887

Claims 36, 38, 40, 42 and 44

It is unknown what specific compounds correspond to "a compound having an SALPR inhibitory effect" in the above claims. Even though EXAMPLES etc. are examined, it is not indicated that what substances other than "compound 1" have an SALPR inhibitory effect in practice. An excessively large amount of trials and errors are needed for a person skilled in the art to obtain such a substance other than "compound 1" having an SALPR inhibitory effect. Thus, it does not appear that the above claims are clearly described. Furthermore, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

Claims 37, 39, 41, 43 and 45

It is unknown what specific compounds, other than "compound 1" shown in EXAMPLES, etc., correspond to "a compound obtained by the screening method" in the above claims. Thus, it does not appear that the above claims are clearly described. Furthermore, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

Claims 47 to 52

It is unknown what specific compounds other than "relaxin-3" correspond to "a compound acting on a relaxin-3 receptor" in the above claims. Thus, it does not appear that the above claims are clearly described. Furthermore, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/09, C12Q 1/02, C07K 14/435, 14/705, A61K 38/00, A61P 1/00, 3/04, G01N 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/00-90, C12Q 1/00-70, C07K 14/00-16/46, A61K 38/00, A61P 1/00, 3/04, G01N 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN),
 SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	C. Liu, et. al, Identification of relaxin-3/INSL7 as an endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPCR135, 2003, J Biol Chem, 278 (50), p. 50754-64	1-52
A	C. Liu, et. al, Identification of relaxin-3/INSL7 as a ligand for GPCR142, 2003, J Biol Chem, 278 (50), p. 50765-70	1-52
A	R. A. Bathgate, et. al, Relaxin: new peptides, receptors and novel actions, 2003, Trends Endocrinol Metab, 14 (5), p. 207-13	1-52

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 03. 2005

国際調査報告の発送日

22. 3. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

4N

9286

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	H. Kizawa, et. al, Production of recombinant human relaxin 3 in AtT20 cells, 2003, Regul Pept, 113 (1-3), p. 79-84	1-52
A	S. Sudo, et. al, H3 relaxin is a specific ligand for LGR7 and activates the receptor by interacting with both the ectodomain and the exoloop 2, 2003, J Biol Chem, 278 (10), p. 7855-62	1-52
A	C. S. Samuel, et. al, Physiological or pathological—a role for relaxin in the cardiovascular system?, 2003, Curr Opin Pharmacol, 3 (2), p. 152-8	1-52
PA	WO 2004/112575 A2 (TULARIK INC) 2004.12.29 & US 2005/026194 A1	1-52
A	WO 2003/030930 A1 (HOWARD FLOREY INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY AND MEDICINE) 2003.04.17 & EP 1434599 A1 & US 2005/026822 A1	1-52

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 (下記参照) _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲1-3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 22, 24, 27, 29, 32, 34, 36-45, 47-52の一部は、請求の範囲が明確に記載されていないか、または、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていないため、国際調査を行っていない。理由は、特別ページを参照。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲 1-3、5、10、14、17、22、27、32

上記請求の範囲における「機能に等価な改変ポリペプチド」について、明細書中、「機能に等価な改変ポリペプチド・・とは、1または複数個・・のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列であって、・・リラキシナー3と実質的に同じ活性・・を有するポリペプチドを意味する」とあるが([0013]参照)、例えば、多数のアミノ酸が変異したポリペプチドが、元のポリペプチドと同等の活性を有する蓋然性は低い。それゆえ、具体的にどのような構造を有したポリペプチドが、上記請求の範囲に係るポリペプチドであるか不明であるし、このようなポリペプチドを得ることは、当業者に過度な試行錯誤を必要とするものである。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されているとはいえず、また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 1-3、5、10、14、17、22、27、32

上記請求の範囲における「70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド」について、70%程度の相同性を有するポリペプチドが、元のポリペプチドと同等の活性を有する蓋然性は低い。それゆえ、具体的にどのような構造を有したポリペプチドが、上記請求の範囲に係るポリペプチドであるか不明であるし、このようなポリペプチドを得ることは、当業者に過度な試行錯誤を必要とするものである。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されているとはいえず、また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 7、12、19、24、29、34

上記請求の範囲における「部分」は、どの部分を示しているか不明であり、上記請求の範囲は明確に記載されているとはいえない。また、上記請求の範囲に係る発明は、リラキシナー3に対する結合能を有さない部分ポリペプチドを含み、そのような発明がどのように実施できるか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 36、38、40、42、44

上記請求の範囲における「SALPR阻害作用を有する化合物」は、具体的にどのような化合物であるか不明である。また、実施例等を見ても、「化合物1」以外の物質が実際にSALPR阻害作用を有することが示されておらず、「化合物1」以外のSALPR阻害作用を有する物質を得ることは、当業者に過度な試行錯誤を必要とするものである。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されているとはいえず、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 37、39、41、43、45

上記請求の範囲における「スクリーニング方法により得られる化合物」は、実施例等で示された「化合物1」以外に、具体的にどのような化合物であるか不明である。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されているとはいえず、また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 47-52

上記請求の範囲における「リラキシン-3受容体に作用する化合物」は、「リラキシン-3」以外に、具体的にどのような化合物であるか不明である。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されているとはいえず、また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。